

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-171978

(43)Date of publication of application : 18.06.2002

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
C07K 14/18
// (C12N 15/09
C12R 1:92)

(21)Application number : 2000-367365

(71)Applicant : TOKYOTO IGAKU KENKYU KIKO
TORAY IND INC

(22)Date of filing : 01.12.2000

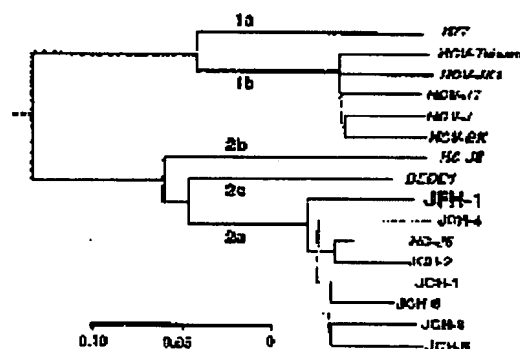
(72)Inventor : WAKITA TAKAJI
KATO TAKANOBU
FURUSAKA AKIHIRO
NAGAI KOZO
MORIYAMA MASAMI

(54) GENE OF FULMINANT HEPATITIS C VIRUS STRAIN

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To afford a clue to the search of gene sequences of fulminant, hepatitis C virus by elucidating total virus genome sequences of hepatitis C virus developing fulminant hepatitis.

SOLUTION: Total genome sequences and amino acid sequences of fulminant hepatitis strain of hepatitis C virus are provided. The total genome sequences have gene information different from that of a conventional HCV strain. By elucidating the gene, a new gene diagnosis of HCV virus is established and a guidance for development of treatment technique for fulminant hepatitis by HCV virus is provided.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C): 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2002-171978
(P2002-171978A)

(43) 公開日 平成14年6月18日 (2002.6.18)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 0 7 K 14/18	4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/18		C 1 2 R 1:92)	4 H 0 4 5
// (C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 R 1:92)		C 1 2 R 1:92)	

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 36 頁)

(21) 出願番号 特願2000-367365(P2000-367365)

(22) 出願日 平成12年12月1日 (2000.12.1)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成12年9月13日
第48回日本ウイルス学会配布の「第48回日本ウイルス学
会抄録集」に発表

(71) 出願人 591063394

財団法人 東京都医学研究機構
東京都新宿区西新宿二丁目8番1号

(71) 出願人 000003159

東レ株式会社
東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号

(72) 発明者 脇田 隆子

東京都板橋区成増3-37-1-302

(72) 発明者 加藤 孝宜

東京都国立市東4-3-33 イーストマン
ション201

(74) 代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔 (外2名)

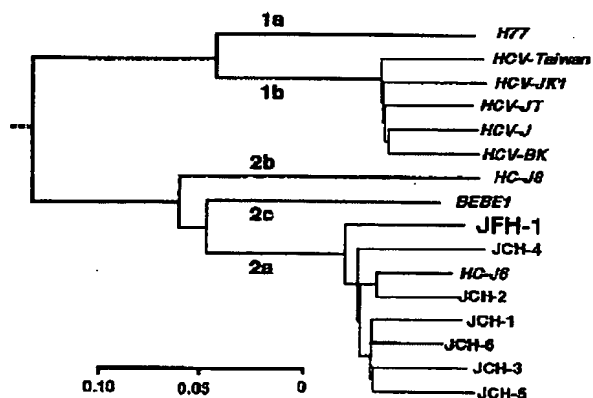
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 劇症C型肝炎ウイルス株の遺伝子

(57) 【要約】

【課題】 劇症肝炎を発症させたC型肝炎ウイルスの全
ウイルスゲノム配列を解明し、その遺伝子配列検索の手
がかりを提供すること。

【解決手段】 C型肝炎ウイルス劇症肝炎株の全ゲノム
配列及びアミノ酸配列に関する。かかる全ゲノム配列
は、従来のHCV株が有する遺伝子情報と異なる遺伝子
情報を有するものであり、そのような遺伝子を解明する
ことにより、新たなHCVウイルスの遺伝子診断法の確
立、更にはHCVウイルスによる劇症肝炎に対する治療
方法の開発への指針を与えるものである



【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号2に示すアミノ酸配列のうち、アミノ酸番号161～191で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド。

【請求項2】 アミノ酸残基数が31～3033である請求項1記載のポリペプチド。

【請求項3】 配列番号2に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド。

【請求項4】 請求項1～3のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードする塩基配列を含むDNA。

【請求項5】 配列番号1に示す塩基配列のうち、ヌクレオチド番号821～913で表される塩基配列と同一又は相補的な塩基配列を含むDNA。

【請求項6】 塩基数が93～9678である請求項4又は5記載のDNA。

【請求項7】 配列番号1に示す塩基配列と同一又は相補的な塩基配列からなるDNA。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、C型肝炎ウイルスによる劇症肝炎を罹患した患者より検出されたC型肝炎ウイルスの遺伝子及び該遺伝子によりコードされるポリペプチドに関する。

【0002】

【従来の技術】わが国では、劇症肝炎の原因の90%以上がウイルス性肝炎といわれているが、そのなかでもA型肝炎ウイルス（HAV）又はB型肝炎ウイルス（HBV）によるものが多く、C型肝炎ウイルス（HCV）によるものはそれ程多いものではない。しかしながら、稀ではあるが、HCV感染による劇症肝炎も報告されており、したがってHCVは、劇症肝炎を発症する原因ウイルスともなり得る可能性を秘めている。

【0003】ところで、C型肝炎は、A型肝炎又はB型肝炎と異なり、一般的には、HCVに感染しても、強い急性肝炎となることは少なく、感染の急性期であっても、まったく無症状のまま進行し、その後に慢性感染することが多い。したがって、他のウイルス感染症における強毒、弱毒株の相違が、ウイルスゲノムの突然変異によることなどから考えると、一般的に前記のような慢性感染の経過を示すHCVと、劇症肝炎を発症させるHCVとの間には、ウイルスゲノム上に遺伝子情報の違いがあるものと推測することができる。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】そのため、HCV感染による劇症肝炎患者から分離したHCVの全ウイルスゲノムをクローニングし、その配列を決定し、劇症肝炎を引き起こすHCVの遺伝子を解明することは、新たなHCVウイルスの培養法の確立、感染性HCVのcDNAクローンの確立、HCVウイルスの病原性の相違を決定する遺伝子領域の探索、又は新たなHCVウイルスの遺

伝子診断法の確立、更にはHCVウイルスによる劇症肝炎に対する治療法の開発等にとって、極めて重要なことと考えられる。したがって、本発明は前記の点に鑑み、劇症肝炎を発症させたC型肝炎ウイルスの全ウイルスゲノム配列を解明して、その遺伝子配列検索の手がかりを提供することを課題とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】かかる課題を解決するために、本発明者は、C型肝炎ウイルス（HCV）感染による劇症肝炎患者から分離したHCVの全ウイルスゲノムのクローニングし、その塩基配列を決定し、これまで報告されているウイルスゲノム配列と比較を行った。その結果、劇症C型肝炎患者から分離されたウイルス株は、慢性肝炎患者から分離されたウイルス株とは異なる遺伝子情報を有する、全長9678塩基長を有する、配列番号1に示す塩基配列を有するものであり、該塩基配列の341番から9439番に、配列番号2に示す3033個のアミノ酸残基をコードする長い翻訳領域が存在することを確認するとともに、配列番号2に示すアミノ酸配列のうち、特にアミノ酸番号161～191で表されるアミノ酸配列が公知のHCVのものと異なる特徴的部分であることを見出し、本発明を完成させた。

【0006】即ち、本発明は、以下の発明を包含する。

（1）配列番号2に示すアミノ酸配列のうち、アミノ酸番号161～191で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド。

（2）アミノ酸残基数が31～3033である前記

（1）に記載のポリペプチド。

（3）配列番号2に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド。

（4）前記（1）～（3）のいずれかに記載のポリペプチドをコードする塩基配列を含むDNA。

（5）配列番号1に示す塩基配列のうち、ヌクレオチド番号821～913で表される塩基配列と同一又は相補的な塩基配列を含むDNA。

（6）塩基数が93～9678である前記（4）又は

（5）に記載のDNA。

（7）配列番号1に示す塩基配列と同一又は相補的な塩基配列からなるDNA。

【0007】本発明により提供される劇症肝炎を発症させたHCVのゲノム配列は、従来の慢性C型肝炎患者から分離されたウイルス株とは異なった遺伝子情報を有することから、その病原性が異なるものである。したがって、本塩基配列の翻訳領域より、従来のHCV株とは異なる遺伝子情報をもつ遺伝子配列を決定し、それを利用することにより、前記する、新たなHCVウイルスの遺伝子診断法の確立、更にはHCVウイルスによる劇症肝炎に対する遺伝子治療法の開発に一つの指針を与えるものである。

【0008】例えば、慢性感染の経過を示す公知のHC

Vについては、既に、クローニングされた遺伝子をもとに作成された組換え体ウイルス蛋白質を抗原に用いて輸血用血液中に存在する抗ウイルス抗体を検出する系が構築されており(Kuo G. et al., Science, 244, 362 (1989))、また、逆転写反応によりRNA遺伝子をそれと相補的なcDNAに置換した後、その一部をポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法によって増幅するというRT-PCR法によってHCV遺伝子を高感度に検出する系が確立されている(Okamoto H. et al., Japan. J. Exp. Med., 60, 215(1990))。そして、これらの方法によってHCVが感染している輸血用血液を発見することが可能になっている。したがって、これらの方法に本発明を適用することにより、従来法では検出することができなかった劇症肝炎を発症させるHCVの検出が可能になると考えられる。

【0009】

【発明の実施の形態】本発明のポリペプチドは、配列番号2に示すアミノ酸番号1～3033からなるアミノ酸配列のうち、アミノ酸番号161～191で表されるアミノ酸配列を含むものであり、該ポリペプチドを構成するアミノ酸残基の数は、通常31～3033である。

【0010】本発明のポリペプチドは、配列番号2に示すアミノ酸配列のうち、アミノ酸番号161～191で表されるアミノ酸配列が特に公知のHCVと異なる特徴的部分である。したがって、前記アミノ酸配列以外の部分においては、1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されていてもよい。前記のアミノ酸の欠失、置換又は付加は、出願前周知技術である部位特異的変異誘発法により実施することができる。

【0011】かかる1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドは、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)

(以下「モレキュラー・クローニング第2版」という。)、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1～38, John Wiley & Sons (1987-1997) (以下「カレント・プロトコルズ・イン・モレキュラー・バイオロジー」という。)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5662 (1984)、Science, 224, 1431 (1984)、W085/00817、Nature, 316, 601 (1985)等に記載の方法に準じて調製することができる。

【0012】本発明のDNAは、前記ポリペプチドをコードする塩基配列を含むDNAであり、例えば、配列番号1に示すヌクレオチド番号1～9678からなる塩基配列のうち、ヌクレオチド番号821～913で表される塩基配列と同一又は相補的な塩基配列を含むDNAが

挙げられる。本発明のDNAの塩基数は、通常93～9678である。

【0013】前記の配列番号1に示す塩基配列のうち、ヌクレオチド番号821～913で表される塩基配列と同一又は相補的な塩基配列を含むDNAは、ヌクレオチド番号821～913で表される塩基配列を含む、配列番号1に示す塩基配列の全配列又は部分配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズしうるDNAを包含する。

【0014】前記の「ストリンジントな条件下でハイブリダイズしうるDNA」とは、前記ヌクレオチド番号821～913で表される塩基配列を含む、配列番号1に示す塩基配列の全配列又は部分配列からなるDNAをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法、サザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニー又はブランク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7～1.0MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2倍濃度のSSC(saline-sodium citrate)溶液(1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウムよりなる)を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAが挙げられる。

【0015】ハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコルズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press(1995)等の実験書に記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズしうるDNAとしては、具体的には、前記ヌクレオチド番号821～913で表される塩基配列を含む、配列番号1に示す塩基配列の全配列又は部分配列と少なくとも80%以上の相同性を有するDNA、好ましくは95%以上の相同性を有するDNAが挙げられる。

【0016】劇症C型肝炎ウイルスのクローニングは、例えば、次のようにして行うことができる。劇症C型肝炎患者の血清から全RNAを調製する方法として、酸性グアニジンイソチオシアネート・フェノール・クロロホルム(acid-guanidinium-isothiocyanate-phenol-chloroform: AGPC)法[Analytical Biochemistry, 162, 156 (1987)、実験医学 9, 1937 (1991)、日本ジーン社製ISOGEN-LS]、チオシアン酸グアニジントリフルオロ酢酸セシウム法[Methods in Enzymology, 154, 3 (1987)]等を用いることができる。

【0017】全RNAからポリ(A)⁺RNAとしてmRNAを調製する方法として、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法(モレキュラー・クローニング第2版)やオリゴdTラテックスを用いる方法等を用いるこ

とができる。ファースト・トラック・mRNA単離キット〔Fast Track mRNA Isolation Kit: インビトロジェン (Invitrogen) 社製〕、クイック・プレップ・mRNA精製キット〔Quick Prep mRNA Purification Kit: ファルマシア (Pharmacia) 社製〕等のキットを用いて血清等から直接mRNAを調製することもできる。得られた全RNA又はmRNAを用い、常法によりcDNAライブラリーを作製する。

【0018】cDNAライブラリー作製法としては、モレキュラー・クローニング第2版やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、DNA Cloning: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995) 等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えばマウス白血病ウイルスリバーストランスクリプターゼ (Superscript II, Life Technologies社製: ロックビル、メリーランド)、スーパースクリプト・プラスミド・システム・フォー・cDNA・シンセシス・アンド・プラスミド・クローニング〔SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning: ギブコBRL (Gibco BRL) 社製〕やザップー・cDNA・シンセシス・キット〔ZAP-cDNA Synthesis Kit, ストラタジーン社製〕を用いる方法等が挙げられる。

【0019】cDNAライブラリーを作製するためのクローニングベクターとしては、大腸菌K12株中で自律複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる。具体的には、ZAP Express〔ストラタジーン社製、Strategies, 5, 58 (1992)〕、pBluescript II SK(+)〔Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)〕、Lambda ZAP II (ストラタジーン社製)、λgt10、λgt11〔DNA Cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1985)〕、λTriplEx (クローンテック社製)、λExCell (ファルマシア社製)、pT7T318U (ファルマシア社製)、pcD2〔Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)〕、pUC18〔Gene, 33, 103 (1985)〕、pAMo〔J. Biol. Chem., 268, 22782-22787 (1993)〕、別名pAMoPRC3Sc (特開平05-336963号) 等が挙げられる。

【0020】宿主微生物としては、大腸菌*Escherichia coli*に属する微生物であればいずれも用いることができる。具体的には、*Escherichia coli* XL1-Blue MRF'〔ストラタジーン社製、Strategies, 5, 81 (1992)〕、*Escherichia coli* C600〔Genetics, 39, 440 (1954)〕、*Escherichia coli* Y1088〔Science, 222, 778 (1983)〕、*Escherichia coli* Y1090〔Science, 222, 778 (1983)〕、*Escherichia coli* NM522〔J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)〕、*Escherichia coli* K802〔J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)〕、*Escherichia coli* JM105〔Gene, 38, 275 (1985)〕、*Escherichia coli* SOLRTM Strain (ストラタジーン社製)、*Escherichia coli* LE392 (モ

レキュラー・クローニング第2版) 等を用いることができる。

【0021】前記方法により作製したcDNAライブラリーに加え、市販のcDNAライブラリーも利用することができる。前記で作製したcDNAライブラリーより、本発明のDNAを有するcDNAクローンを、アイソトープ又は蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法又はブランク・ハイブリダイゼーション法〔モレキュラー・クローニング第2版〕等により選択することができる。

【0022】プローブとしては、一部明らかになっている塩基配列に基いたプライマーを用いて、PCR〔PCR Protocols, Academic Press (1990)〕を利用した方法でcDNAの一部を増幅した断片や、一部明らかになっている塩基配列に基いたオリゴヌクレオチドを利用することができる。

【0023】プライマーとして、全長cDNAの5'末端側及び3'末端側の両方の塩基配列がEST等により明らかになっている場合には、その塩基配列に基いて調製したプライマーを用いることができる。前記により選択された本発明のDNAを有するcDNAクローンより、前記の方法に準じてmRNAからcDNAを合成する。

【0024】また、該cDNAの両端にアダプターを付加し、このアダプターの塩基配列と一部明らかになっている塩基配列に基づいたプライマーでPCRを行う5'-RACE (rapid amplification of cDNA ends) 及び3'-RACE〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998 (1988)〕により、プライマーに用いた配列よりも5'末端側及び3'末端側のcDNA断片を得ることができる。得られたcDNA断片をつなぎあわせることにより、本発明の全長DNAを取得することができる。

【0025】前記の方法により取得されたDNAの塩基配列は、該DNA断片をそのまま又は適当な制限酵素等で切断後常法によりベクターに組み込み、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)〕、あるいはパーキン・エルマー社 (PerkinElmer: 373A・DNAシーケンサー)、ファルマシア社、ライコア (LI-COR) 社等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより決定することができる。

【0026】前記方法により得られた塩基配列情報に基づき、DNA合成機で化学合成することにより目的とするDNAを調製することもできる。DNA合成機としては、チオホスファイト法を利用した島津製作所社製のDNA合成機、フォスフォアミダイト法を利用したパーキン・エルマー社製のDNA合成機model 392等が挙げられる。

【0027】得られた塩基配列の新規性に関しては、BLAST等の相同性検索プログラムを用いて、GenBank、EMB

L及びDDBJ等の塩基配列データベースを検索することにより確認することができる。新規な塩基配列については、アミノ酸配列に変換した後、FASTA、フレームサーチ(FrameSearch)等の相同性検索プログラムを用いて、GenPept、PIR、Swiss-Prot等のアミノ酸配列データベースを検索することにより、相同性をもつ既存の遺伝子を検索することができる。

【0028】前記記載の方法により取得した本発明のDNAを宿主細胞中で発現させ、本発明のポリペプチドを製造するために、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・インモレキュラー・バイオロジー等に記載された方法を用いることができる。すなわち、本発明のDNAを適当な発現ベクターのプロモーター下流に挿入した組換えベクターを造成し、該ベクターを宿主細胞に導入することにより、本発明のポリペプチドを発現する形質転換体を取得し、該形質転換体を培養することにより、本発明のポリペプチドを製造することができる。

【0029】宿主細胞としては、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子が発現できるものであればいずれも用いることができる。発現ベクターとしては、前記宿主細胞において自律複製可能なものは染色体中への組込みが可能で、本発明のDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

【0030】細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合、本発明のポリペプチド遺伝子発現ベクターは原核生物中で自律複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、本発明のDNA及び転写終結配列より構成された組換えベクターであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

【0031】発現ベクターとしては、例えば、pSE280 (インビトロジェン社製)、pGEMEX-1 (Promega社製)、pQE-8 (QIAGEN社製)、pKYP10 (特開昭58-110600号)、pKYP200 [Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)]、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescript II SK(-) (STRATAGENE社)、pTrs30 (FERM BP-5407)、pTrs32 (FERM BP-5408)、pGHA2 (FERM BP-400)、pGKA2 (FERM B-6798)、pTerm2 (特開平3-22979号、US4686191、US4939094、US5160735)、pKK233-3 (アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製)、pGEX (Pharmacia社製)、pETシステム (Novagen社製)、pSupex、pTrxFus (Invitrogen社)、pMAL-c2 (New England Biolabs社)等が挙げられる。

【0032】プロモーターとしては、宿主細胞中で発現

できるものであればいかなるものでもよい。例えば大腸菌を宿主とした場合は、trpプロモーター (P_{trp})、lacプロモーター (P_{lac})、Pl₁プロモーター、T7プロモーター、PRプロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーター等が挙げられる。また、P_{trp}を2つ直列させたプロモーター (P_{trp}×2)、tacプロモーター、T7lacプロモーター、let₁プロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。枯草菌を宿主とした場合は、枯草菌のファージであるSPO1やSPO2のプロモーター、penPプロモーター等が挙げられる。

【0033】リボソーム結合配列としては、シャイン・ダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば6~18塩基) に調節したプラスミドを用いることが好ましい。本発明のDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

【0034】宿主細胞としては、エシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、ブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、シュドモナス属等に属する微生物、例えば、*Escherichia coli* XL1-Blue、*Escherichia coli* XL2-Blue、*Escherichia coli* DH1、*Escherichia coli* MC1000、*Escherichia coli* KY3276、*Escherichia coli* W1485、*Escherichia coli* JM109、*Escherichia coli* HB101、*Escherichia coli* No.49、*Escherichia coli* W3110、*Escherichia coli* NY49、*Serratia ficaria*、*Serratia fonticola*、*Serratia liquefaciens*、*Serratia marcescens*、*Bacillus subtilis*、*Bacillus amyloliquefaciens*、*Brevibacterium ammoniagenes*、*Brevibacterium immariophilum* ATCC14068、*Brevibacterium saccharolyticum* ATCC14066、*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032、*Corynebacterium glutamicum* ATCC14067、*Corynebacterium glutamicum* ATCC13869、*Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870、*Microbacterium ammoniaphilum* ATCC15354、*Pseudomonas* sp. D-0110等が挙げられる。

【0035】組換えベクターの導入方法としては、前記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法 (特開昭63-248394号)、エレクトロポレーション法 [Gene, 17, 107 (1982)、Molecular & General Genetics, 168, 111 (1979)]等が挙げられる。酵母菌株を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEpl3 (ATCC37115)、YEpl24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419)、pHS19、pHS15等を用いることができる。

【0036】プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモ-

ター、ADHプロモーター、gal 1プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショックポリペプチドプロモーター、MF α 1プロモーター、CUP 1プロモーター等のプロモーターが挙げられる。

【0037】宿主細胞としては、サッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、クルイペロミセス属、トリコスポロン属、シワニオミセス属、ピヒア属等に属する酵母菌株が挙げられ、具体的には、*Saccharomyces cerevisiae*、*Schizosaccharomyces pombe*、*Kluyveromyces fragilis*、*Trichosporon pullulans*、*Schwanniomyces alluvius*、*Pichia pastoris*等が挙げられる。

【0038】組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods in Enzymology, 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 4889 (1984)]、酢酸リチウム法 [Journal of Bacteriology, 153, 163 (1983)]等が挙げられる。

【0039】動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、p cDNA 1/Amp (インビトロジェン社製)、p cDNA 1、pAMoERC3Sc、p CDM8 [Nature, 329, 840 (1987)]、p AGE 107 [特開平3-22979号、Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、p REP 4 (インビトロジェン社製)、p AGE 103 [Journal of Biochemistry, 101, 1307 (1987)]、p AMo、p AMoA、p AS 3-3 (特開平2-227075号)等が用いられる。

【0040】プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) のIE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター又はメタロチオネインのプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR α プロモーター等が挙げられる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

【0041】動物細胞としては、マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞又はNamalwa KJM-1細胞、ヒト胎児腎臓細胞、ヒト白血病細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、HBT5637 (特開昭63-299号)等が挙げられる。マウス・ミエローマ細胞としては、SP2/0、NS0等、ラット・ミエローマ細胞としてはYB2/0等、ヒト胎児腎臓細胞としてはHEK293 (ATCC: CRL-1573)等、ヒト白血病細胞としては、BALL-1等、アフリカミドリザル腎臓細胞としてはCOS-1、COS-7等が挙げられる。

【0042】組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytote

chnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075号)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]、Virology, 52, 456 (1973)に記載の方法等が挙げられる。

【0043】昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばバキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアル [Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)]、モレキュラー・バイオロジー、ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Biology, A Laboratory Manual)、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Bio/Technology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、ポリペプチドを発現することができる。

【0044】即ち、組換え遺伝子導入ベクター及びバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、更に組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、ポリペプチドを発現させることができる。該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBac111 (ともにインビトロジェン社製)等が挙げられる。バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) 等を用いることができる。

【0045】昆虫細胞としては、*Spodoptera frugiperda*の卵巣細胞、*Trichoplusia ni*の卵巣細胞、カイコ卵巣由来の培養細胞等を用いることができる。*Spodoptera frugiperda*の卵巣細胞としてはSf9、Sf21 (バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアル)等、*Trichoplusia ni*の卵巣細胞としてはHigh 5、BTI-TN-5B1-4 (インビトロジェン社製)等、カイコ卵巣由来の培養細胞としては*Bombyx mori* N4等が挙げられる。

【0046】組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への前記組換え遺伝子導入ベクターと前記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075号)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]等が挙げられる。遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第2版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合蛋白質発現等を行うことができる。酵母、動物細胞又は昆虫細胞により発現させた場合には、糖又は糖鎖が付加されたポリペプチドを得ることができる。

【0047】以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に本発明のポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、本発明のポリペプチドを製造することができる。本発明の形質転換

体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。

【0048】大腸菌又は酵母等の微生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。炭素源としては、グルコース、フルクトース、スクロース、糖蜜、デンプン、デンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類が用いられる。

【0049】窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩又はその他の含窒素化合物の他、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕及び大豆粕加水分解物、各種発酵菌体又はその消化物等が用いられる。無機物としては、リン酸水素ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガ、硫酸銅、炭酸カルシウム等が用いられる。

【0050】培養は、通常振盪培養又は深部通気攪拌培養等の好氣的条件下、15～40℃で16～96時間行う。培養期間中、pHは3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機又は有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。培養中には必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0051】プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピルβ-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドール酢酸(IAA)等を培地に添加してもよい。

【0052】動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI 1640培地、EagleのMEM培地又はこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。培養は、通常5%CO₂存在下、35～37℃で3～7日間行い、培養中には必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0053】昆虫細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地[ファーマンジェン(Pharmingen)社製]、Sf9001SFM[ライフテクノロジーズ(Life Technologies)社製]、ExCell400、ExCell405[いずれもJRHバイ

オサイエンス(JRH Biosciences)社製]等が用いられる。

【0054】培養条件は、pH6～7、培養温度25～30℃がよく、培養時間は通常1～5日間である。また、培養中には必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。前記形質転換体の培養液から、前記方法により発現させた本発明のポリペプチドを単離精製するためには、通常の酵素の単離、精製法を用いればよい。例えば、本発明のポリペプチドが、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液に懸濁後、超音波破砕機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破砕し、無細胞抽出液を得る。

【0055】前記無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル(DEAE)セファロース、DIAION HPA-75(三菱化学社製)等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-SepharoseFF(ファルマシア社製)等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独又は組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

【0056】また、前記ポリペプチドが細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破砕し、遠心分離を行うことにより得られた沈殿分より、通常の方法により該ポリペプチドを回収後、該ポリペプチドの不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。前記可溶化液を、蛋白質変性剤を含まない又は蛋白質変性剤の濃度が蛋白質が変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、該ポリペプチドを正常な立体構造に構成させた後、前記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。

【0057】本発明のポリペプチド又はその糖修飾体等の誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該ポリペプチド又はその糖鎖付加体等の誘導体を回収することができる。即ち、該培養物を前記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、前記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

【0058】また、本発明のポリペプチドを他のタンパク質との融合タンパク質として生産し、融合したタンパク質に親和性をもつ物質を用いたアフィニティークロマトグラフィーを利用して精製することもできる。例えば、ロウらの方法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8227(1989)、Genes Develop., 4, 1288(1990)]、特開平05-336963号、特開平06-823021号に記載の方法に準じ

て、本発明のポリペプチドをプロテインAとの融合タンパク質として生産し、イムノグロブリンGを用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。また、本発明のポリペプチドをFlagペプチドとの融合タンパク質として生産し、抗Flag抗体を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)〕。更に、該ポリペプチド自身に対する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製することもできる。

【0059】更に、本発明のポリペプチドは、該ポリペプチドの有するアミノ酸配列情報に基づいて、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（*t*-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によっても製造することができる。また、アドバンスト・ケムテック（Advanced ChemTech）社、パーキン・エルマー社、ファルマシア社、プロテイン・テクノロジー・インストゥルメント（Protein Technology Instrument）社、シンセセル・ベガ（Synthecell-Vega）社、パーセプティブ（PerSeptive）社、島津製作所等のペプチド合成機を利用し化学合成することもできる。

【0060】精製した本発明のポリペプチドの構造解析は、蛋白質化学で通常用いられる方法、例えば遺伝子クローニングのためのタンパク質構造解析（平野久著、東京化学同人発行、1993年）に記載の方法により実施可能である。トランスジェニック動物とは、外来遺伝子を動物の発生初期に導入して得られる動物のことであり、例えばマウス、ラット、又はウシ、ヒツジなどの家畜などが挙げられる。以下にトランスジェニックマウスの作製について述べる。

【0061】トランスジェニックマウスはHogan, B.ら〔Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual, 2nd ed. 1994. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.〕及びYamamura, K.ら〔J. Biochem., 96, 357-363 (1984)〕の方法に準じて製造することができる。すなわち、ホルモン処理した雌のC57BL/6マウスを交配させた後、受精卵を取り出し、受精卵の雄性前核内に、調製したベクター部分を含まない導入遺伝子のフラグメントをマイクロガラスピペットを用いてマイクロインジェクションする。得られた遺伝子導入卵のうち、生き残った数百個の偽妊娠雌マウスの卵管に移植し、トランスジェニックマウスを作製する。

【0062】更に、本発明のポリペプチドを認識する抗体は、以下のようにして作製することができる。まず、前記で得られた該蛋白質を抗原として免疫する。免疫する方法としては、動物の皮下、静脈内又は腹腔内に抗原をそのまま投与してもよいが、抗原性の高いキャリアタンパク質を結合させて投与したり、又は適当なアジュバントとともに抗原を投与することが好ましい。

【0063】キャリアタンパク質としては、スカシガイ

ヘモシアニン、キーホールリンペットヘモシアニン、牛血清アルブミン、牛チログロブリン等が挙げられ、アジュバントとしては、フロインドの完全アジュバント（Complete Freund's Adjuvant）、水酸化アルミニウムゲルと百日咳菌ワクチン等が挙げられる。免疫動物としては、ウサギ、ヤギ、3～20週令のマウス、ラット、ハムスターなどの非ヒト哺乳動物が挙げられる。

【0064】抗原の投与は、1回目の投与の後、1～2週間毎に3～10回行う。抗原の投与量は動物1匹当たり50～100 μ gが好ましい。各投与後、3～7日目に免疫動物の眼底静脈叢又は尾静脈より採血し、該血清の抗原との反応性について、酵素免疫測定法〔酵素免疫測定法（ELISA法）：医学書院刊（1976年）〕などで確認する。そして、該血清が十分な抗体価を示した非ヒト哺乳動物を、血清又は抗体産生細胞の供給源とする。

【0065】ポリクローナル抗体は、該血清を分離、精製することにより調製することができる。モノクローナル抗体は、該抗体産生細胞と非ヒト哺乳動物由来の骨髓腫細胞とを融合させてハイブリドーマを作製し、該ハイブリドーマを培養するか、動物に投与して該細胞を腹水癌化させ、該培養液又は腹水を分離、精製することにより調製することができる。抗体産生細胞は、抗原投与された非ヒト哺乳動物の脾細胞、リンパ節、末梢血などから採取する。

【0066】骨髓腫細胞としては、マウスから得られた株化細胞である、8-アザグアニン耐性マウス（BALB/c由来）骨髓腫細胞株P3-X63Ag8-U1（P3-U1）〔G. Kohlerら：ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・イムノロジー（Euro. J. Immunol.）, 6, 511 (1976)〕、SP2/0-Ag14（SP-2）〔M. Shulmanら：ネイチャー（Nature）, 276, 269 (1978)〕、P3-X63-Ag8653（653）〔J. F. Kearneyら：ジャーナル・オブ・イムノロジー（J. Immunol.）, 123, 1548 (1979)〕、P3-X63-Ag8（X63）〔G. Kohlerら：ネイチャー（Nature）, 256, 495 (1975)〕など、イン・ビトロ（in vitro）で増殖可能な骨髓腫細胞であればいかなるものでもよい。これらの細胞株の培養及び継代についてはアンチボディーズ・ア・ラボラトリー・マニュアル〔Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988、以下「アンチボディーズ・ア・ラボラトリー・マニュアル」という。〕に従い、細胞融合時までには2 \times 10⁷個以上の細胞数を確保する。

【0067】前記で得られた抗体産生細胞と骨髓腫細胞とを洗浄した後、ポリエチレングリコール-1000（PEG-1000）などの細胞凝集性媒体を加え、細胞を融合させ、培地中に懸濁させる。細胞の洗浄にはMEM培地又はPBS（リン酸水素二ナトリウム1.83g、リン酸二水素カリウム0.21g、食塩7.65g、蒸留水1リットル、pH7.2）などを用いる。また、融合細胞を懸濁させる培地としては、目的の融合細胞のみを選択的に得られるように、HAT培

地【正常培地【RPMI-1640培地に1.5mMグルタミン、 5×10^{-5} M 2-メルカプトエタノール、10 μ g/mlジェンタマイシン及び、10%牛胎児血清(FCS)(CSL社製)を加えた培地】に 10^{-4} Mヒポキサンチン、 1.5×10^{-5} Mチミジン及び 4×10^{-7} Mアミノプテリンを加えた培地】を用いる。

【0068】培養後、培養上清の一部をとり、酵素免疫測定法により、抗原蛋白質に反応し、非抗原蛋白質に反応しないサンプルを選択する。ついで、限界希釈法によりクローニングを行い、酵素免疫測定法により安定して高い抗体価の認められたものをモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

【0069】酵素免疫測定法

抗原蛋白質又は抗原蛋白質を発現した細胞などを96ウェルプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清もしくは精製抗体を第一抗体として反応させる。第一抗体反応後、プレートを洗浄して第二抗体を添加する。第二抗体とは、第一抗体のイムノグロブリンを認識できる抗体を、ビオチン、酵素、化学発光物質又は放射線化合物等で標識した抗体である。具体的にはハイブリドーマ作製の際にマウスを用いたのであれば、第二抗体としては、マウスイムノグロブリンを認識できる抗体を用いる。反応後、第二抗体を標識した物質に応じた反応を行い、抗原に特異的に反応するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとして選択する。

【0070】モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ細胞を培養して得られる培養液、又はプリスタン処理〔2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン(Pristane)0.5mlを腹腔内投与し、2週間飼育する〕した8~10週令のマウス又はヌードマウスに、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞を腹腔内投与して腹水癌化させた腹水から、分離、精製することにより調製できる。

【0071】モノクローナル抗体を分離、精製する方法としては、遠心分離、40~50%飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿法、DEAE-セファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテインA又はG-カラム又はゲル濾過カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独又は組み合わせて行う方法が挙げられる。この方法により、IgG又はIgM画分を回収し、精製モノクローナル抗体を取得することができる。

【0072】

【実施例】以下、本発明を実施例により具体的に説明する。

(実施例1)

1. 劇症C型肝炎ウイルスのクローニング：

(1) 患者背景：輸血、薬剤性肝障害、アルコール性肝障害などの既往歴のない男性(32歳)が急性の肝障害を発症し治療のため入院した。入院後直ちに肝性昏睡となり、劇症肝炎と診断された。急性期の血清よりHCVが検出され、その他のウイルスマーカーは検出できず、HCV感染による劇症肝炎と診断された。その後の治療

により患者は回復し、肝機能正常となり、ウイルスも検出されなくなった。その経過を図1に示す。

【0073】(2) ウイルスの全RNAの調製及びcDNAの合成

患者の急性期に採取した血清250 μ lより、全RNAを、酸性グアニジンイソチオシアネート・フェノール・クロロホルム(acid-guanidinium-isothiocyanate-phenol-chloroform; AGPC)(ISOGEN-LS; 日本ジーン社製)を使用し、抽出し、イソプロパノールにより沈殿させ、エタノールにて洗浄後、20 μ lのDEPC-処理水(和光純薬工業社製)を加え、溶解した。前記で得た全RNAの20 μ l溶液のうち10 μ lを、ランダムプライマー(6-mer)による逆転写、及びマウス白血球ウイルスリバーシトランスクリプターゼ(Superscript II、Life Technologies社製; ロックビル、メリーランド)による処理を、37℃にて1時間行い、cDNAを合成した。

【0074】(3) HCVの単離

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行うべく、1 μ lのcDNAをTaKaRa LA Taqポリメラーゼ(宝酒造社製)に付した。劇症肝炎患者から分離したHCVゲノムの全領域を得るために、HC-J6(アクセッション番号: D00944)のシークエンスをもとにデザインした20-merのPCRプライマーを使用し、5'末端及び3'末端を除くHCVゲノム全領域を含む12個のHCV cDNAフラグメント(DNA断片)に増幅した。

【0075】その12個の各DNA断片のHCVゲノム配列に相当する場所を、HC-J6の核酸配列に従って、その核酸配列の始まりと終わりを番号付けすると、64~466、337~829、637~1303、1158~2348、2305~3491、3489~4648、4566~5951、5902~6983、6967~8015、7972~8872、8700~9262、9251~9613であった。なお、PCRの条件は、95℃30秒間の変性、60℃30秒間のアニーリング、及び70℃1分間の反応を各40サイクル行うことによるPCRを行った。

【0076】続いて、5'-RACE法及び3'-RACE法を用いて、5'末端側及び3'末端側のウイルスRNAの核酸配列を決定した。即ち、5'末端配列を決定するために、cDNAを5'-非翻訳領域(5'-UTR)プライマー(アンチセンス)により合成し、ターミナルデオキシヌクレオチルトランスフェラーゼにより合成したcDNAの5'末端にポリC配列を付加した後、次いでPCR(cDNA末端の増幅のための5'-RACEシステム: Life Technologies社製; Version 2.0)により増幅した。

【0077】また、3'末端配列を決定するために、抽出したRNAを、ポリ-A-ポリメラーゼ(宝酒造社

製)を使用してポリアデニル化し、(T)33含有の38-merオリゴヌクレオチドによりcDNAに変換し、3'-UTRプライマー及び逆転写に使用するプライマーにより増幅した。増幅生成物をアガロースゲル電気泳動により分離し、次いで、pGEM-T EASYベクター(Promega社、マジソン、ウィスコンシン州)中にクローニングし、Big Dye Terminator Mix及び自動DNAシーケンサーmodel310(PE Biosystems社、カリフォルニア州)によりシーケンスした。

【0078】以上により、全ウイルスゲノム配列を得、これをJFH-1株と命名した。得られたJFH-1株は、全長9678塩基長であり、その塩基配列を配列番号1に示した。以上により決定された全ウイルスゲノムの塩基配列は、その341番から9439番の間に、3033個のアミノ酸残基をコードする長い翻訳領域を有するものであった。そのアミノ酸配列を配列番号2に示した。

【0079】比較のために、遺伝子型2aのHCVに感染している慢性肝炎患者6名よりHCVを分離し、前記と同様にHCVのcDNAをクローニングしてその塩基配列を決定した。これらの全ウイルスゲノムを、それぞれJCH-1株～JCH-6株と称する。なお、これらの株の塩基配列は、JCH-1株=9681塩基長；JCH-2株=9677塩基長；JCH-3株=9678塩基長；JCH-4株=9676塩基長；JCH-5株=9691塩基長及びJCH-6株=9686塩基長であった。

【0080】2. ウイルスゲノムの塩基配列の解析
劇症肝炎患者から分離したJFH-1株と、慢性肝炎患

者から分離したJCH-1株～JCH-6株、及び、すでにその塩基配列が解明されているHCV-J6株(アクセッション番号：D00944)との遺伝子配列上の違いを知るために、6パラメーター法(Gojoboriら、J. Mol. Evol., 1982; 18: 414-423)及びN-J(Neighbor-Joining)法(Saitouら、Mol. Biol. Evol., 1987; 4: 406-425)による分子系統樹による解析を行った。その結果を図2に示す。

【0081】図中に示した結果から判明するように、慢性肝炎患者から分離された全てのクローンが、クラスターを形成するが、劇症肝炎患者から分離したJFH-1株は、他の遺伝子型(1a, 1b, 2b, 2c)に比べると、遺伝子型2aに近いものの、明らかに慢性肝炎患者から分離されたクロンのクラスターからは独立している。更に、HCVゲノム上の遺伝子領域ごとに、その各分離株の遺伝子的な違いを知るために、全ての分離株間の遺伝子距離と、JFH-1株と他の株間の遺伝子距離を、核酸については6パラメーター法で、またアミノ酸は木村の2パラメーター法(Kimura, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 1969; 63: 1181-1188)で計算した。

【0082】劇症肝炎患者から分離されたJFH-1株と、他の慢性肝炎患者から分離された株間の、遺伝子距離の平均を、全ての分離株間の遺伝子距離の平均で割って得られる比を求めて、JFH-1株が各遺伝子領域でどの程度他の分離株と異なっているかを検討した。核酸についての結果を表1に、アミノ酸についての結果を表2に示す。

【0083】

【表1】

領 域	核 酸		
	JFH-1* (平均±SD)	遺伝型2a** (平均±SD)	比率
5'-UTR	0.0130 ± 0.0039	0.0194 ± 0.0048	1.387
core	0.0744 ± 0.0075	0.0595 ± 0.0119	1.251
E1	0.1182 ± 0.0104	0.1199 ± 0.0173	0.986
E2	0.1580 ± 0.0162	0.1428 ± 0.0233	1.107
NS2	0.1498 ± 0.0098	0.1205 ± 0.0256	1.243
NS3	0.1145 ± 0.0091	0.0980 ± 0.0142	1.168
NS4A	0.1407 ± 0.0166	0.1127 ± 0.0275	1.249
NS4B	0.0949 ± 0.0081	0.0806 ± 0.0117	1.178
NS5A	0.1122 ± 0.0081	0.0918 ± 0.0165	1.222
NS5B	0.0835 ± 0.0072	0.0688 ± 0.0122	1.213
3'-UTR***	0.0791 ± 0.0230	0.0799 ± 0.0266	0.989
全ゲノム	0.1136 ± 0.0073	0.0969 ± 0.0140	1.173

【0084】UTR：比翻訳領域

E：エンベロープ領域

NS：比構造領域

*：遺伝子距離の平均は、JFH-1株と他の遺伝子型

2a株との間で計算した。

** : 遺伝子距離の平均は、JFH-1株を含む、遺伝子型2a株との間の全ての間で計算した。

*** : HCV-J6株を含まないデータである。

【0085】

【表2】

領域	アミノ酸		
	JFH-1* (平均±SD)	遺伝型2a** (平均±SD)	比率
5'-UTR	NA		
core	0.0741 ± 0.0129	0.0475 ± 0.0225	1.560
E1	0.1023 ± 0.0196	0.1089 ± 0.0231	0.940
E2	0.1399 ± 0.0130	0.1313 ± 0.0155	1.066
NS2	0.1413 ± 0.0157	0.1088 ± 0.0307	1.298
NS3	0.0657 ± 0.0050	0.0449 ± 0.0138	1.464
NS4A	0.0456 ± 0.0104	0.0437 ± 0.0182	1.044
NS4B	0.0239 ± 0.0053	0.0196 ± 0.0065	1.223
NS5A	0.1616 ± 0.0100	0.1013 ± 0.0378	1.596
NS5B	0.0555 ± 0.0074	0.0460 ± 0.0108	1.208
3'-UTR***	NA		
全ゲノム	0.0918 ± 0.0052	0.0716 ± 0.0139	1.282

【0086】NA : 計算せず

UTR : 比翻訳領域

E : エンベロープ領域

NS : 比構造領域

* : 遺伝子距離の平均は、JFH-1株と他の遺伝子型2a株との間で計算した。

** : 遺伝子距離の平均は、JFH-1株を含む、遺伝子型2a株との間の全ての間で計算した。

*** : HCV-J6株を含まないデータである。

【0087】以上のデータから判断すると、核酸での計算では、JFH-1株と他の株間の平均遺伝子距離は、0.1136±0.0073であり、全分離株のHCVの遺伝子全長における平均遺伝子距離は、0.0969±0.0140であり、その比は1.173であった。各領域別に見ると、平均遺伝子距離の比が最も高いのは、5'-UTRであり、その比は1.387であった。

【0088】また、アミノ酸での計算では、全翻訳領域のJFH-1株と他の株間の平均遺伝子距離は、0.0918±0.0052であり、全分離株のHCVの遺伝子全長における平均遺伝子距離は、0.0716±0.0139であり、その比は1.282であった。各領域別に見ると、平均遺伝子距離の比が高いのは、コア、NS3、NS5aであり、その比はそれぞれ1.560、1.464、1.596であった。したがって、劇症肝炎患者から分離されたJFH-1株には、これらの領域に、他のHCV分離株と異なる遺伝子情報を有することが考えられる。

【0089】(実施例2) 劇症肝炎分離株(JFH-1)の遺伝子配列の解析からアミノ酸ではコア、NS3、NS5aの各領域が特に慢性肝炎の分離株の配列と異なっていることが示された。これらの変異によるJFH-1株の性質の変化が劇症肝炎の発症機序に関与している可能性を考え、JFH-1株と慢性肝炎分離株とのウイルス蛋白質の発現を検討した。

【0090】コア蛋白質はウイルスのキャプシドを形成すると考えられている構造蛋白質だが、最近の報告では感染細胞内で感染細胞の様々な遺伝子発現を調節している多機能蛋白質と考えられている。コア蛋白質はそのC末端がプロセッシングされるが、その切断部位により分子量の異なる2種類のコア蛋白質が作られる。191アミノ酸からなるコア蛋白質をP23と呼び、179又は182アミノ酸からなるコア蛋白質をP21と呼ぶ。ウイルス粒子のキャプシドを形成しているのはP21と考えられるが、P21とP23は異なる機能と性質を持つことが予想されている。劇症肝炎分離株JFH-1のコア蛋白質P21とP23の発現について検討した。

【0091】実験1：劇症肝炎分離株JFH-1と慢性肝炎5例から分離したウイルス株(JCH-1~5)及びすでに報告されているJ6CF株のコア領域のアミノ酸配列を図3に示す。このアミノ酸配列を発現するウイルス遺伝子を図4(A)に示すようにT7プロモーター配列とポリAシグナル配列の間に挿入した。この発現ベクターを鋳型として、TNT Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega)を用いてコア蛋白質を発現させ、SDS-PAGEにて電気泳動し、PVD膜に転写して

抗コアモノクローナル抗体で検出した。結果を図4

(B)に示す。JFH-1株からはP21とP23の2種類のコア蛋白質が検出されたが、慢性肝炎分離株からは主にP23のみが検出された。

【0092】実験2：次にJFH-1株とJCH-1株のキメラ遺伝子を作製することによりJFH-1株のどの部分の変異がP21/P23の発現の変化に関与しているかを検討した。図5(A)に示すように、JFH-1株とJCH-1株を60番目、90番目、160番目のアミノ酸で入れ替えたキメラ遺伝子を作製した。即ち、1～60番のアミノ酸配列と61番以降のアミノ酸配列とのキメラペプチド、1～90番のアミノ酸配列と91番以降のアミノ酸配列とのキメラペプチド、及び1～160番のアミノ酸配列と161番以降のアミノ酸配列とのキメラペプチドをそれぞれコードするキメラ遺伝子を作製した。図5(A)に示すコア遺伝子領域の斜線部はJCH-1株と同一の部分、白塗りの部分はJFH-1株と同一の部分を示す。実験1と同じ方法でこの遺伝子を発現させた。結果を図5(B)に示す。この結果からJFH-1株と同じP21/P23の発現パターンを示すためにはコア蛋白質の161番アミノ酸以降の配列が重要であることがわかった。また、JCH-1株と同じ発現パターンを示すためにもコア蛋白質の161番アミノ酸以降の配列が重要であることがわかった。161番目以降のアミノ酸配列でJFH-1株とJCH-1株で異なるのは164番がJFH-1株：Y、JCH-1株：F、172番がJFH-1株：F、JCH-1株：C、173番がJFH-1株：P、JCH-1株：S、187番がJFH-1株：V、JCH-1株：Tであった。即ち、この4ヶ所の変異すべて又はいくつかの組み合わせでP21/P23の発現パターンが決まることが明らかとなった。

【0093】実験3：実験1と2では発現ベクターはコア領域の遺伝子のみを挿入したものをを用いたため、コア蛋白質の2ヶ所のプロセッシング部位のうちP21を切り出してくるもののみを検討できた。次にコア領域の更に下流つまりE1やE2蛋白質も発現させた状態でP21/P23の発現パターンの変化を検討した。図6

(A)に示すように、ウイルス遺伝子のうち構造遺伝子領域全体を含んだ発現ベクターを構築した。コア領域のみを発現する発現ベクターとともに実験1、2と同じ方法で蛋白質を発現させ、コア蛋白質を検出した。結果を図6(B)に示す。コア領域のみを発現する場合に比べ構造遺伝子全体を発現させると、P21がP23と比べより多く作られるようになるが、JFH-1株ではJCH-1株よりもP21がより多く作られP23はより少なく検出された。

【0094】実験4：P21/P23の発現パターンの変化を細胞内で確認するために実験1で用いた発現ベクターを細胞内に導入して細胞内で発現させた。発現ベク

ターDNAをFuGene6(ロッシュ・ダイアグノスティックス)を用いて293-T細胞に導入し細胞を回収、破碎して、SDS-PAGEにて電気泳動し、PVDF膜に転写して抗コアモノクローナル抗体で検出した。結果を図5に示す。JFH-1株ではP21とP23の両方を検出したが、JCH-1株からは主にP23を検出した。

【0095】以上の実験1～4の結果からJFH-1株は他の慢性肝炎から分離した株と比較してコア蛋白質の発現パターンが異なることが明らかとなった。HCVのコア蛋白質にはP21とP23の2種類があるが、JFH-1株ではP21がより作られやすいことが示された。P21はウイルス粒子のキャプシドを形成する蛋白質であり、JFH-1株ではP21がより多く作られることにより、感染細胞内でウイルス粒子がより多く産生されることが考えられる。

【0096】次に、ウイルスのRNA複製に必要な非構造蛋白質の発現について検討した。RNA複製はRNA replicase活性を持つNS5bにより行われるが、NS5bを含む非構造蛋白質は複合体を形成してウイルスRNA複製を行っていると考えられている。そこで、まずNS5bの発現を検討し、更にNS5bの発現に重要であるNS3の発現を検討した。

【0097】実験5：NS5bの発現を検討するためにJFH-1株とJCH-1株の翻訳領域全体を挿入した発現ベクターを構築した(図8(A))。この発現ベクターを実験4と同じ方法で培養細胞に導入してその細胞を回収、破碎してSDS-PAGEにて電気泳動し、PVDF膜に転写してウエスタンブロット法で検出した。図8(B)の下段に示すようにコア蛋白質はJFH-1株とJCH-1株ともに同じくらいの発現量を示したが、上段に示すNS5bの発現量は明らかにJFH-1株の方が多かった。

【0098】実験6：次にNS5bのプロセッシングに必要なNS3から下流のウイルス遺伝子のみを挿入した発現ベクターを作製してNS3とNS5bの発現を検討した(図9(A))。方法は実験5と同じである。結果を図9(B)に示す。NS3の発現量はJFH-1株の方が多し。しかし、同じ抗体で検出されるNS3のN端側の分解産物が検出され、その量はJCH-1株の方が多かった。つまり、JFH-1株のNS3の方が安定であることが示された。更に、この発現ベクターを用いた場合のNS5bの発現量を検討した。やはりJFH-1株の方がNS5bの発現量が多いことが明らかとなった。実験5及び実験6の結果から、JFH-1株はJCH-1株に比べNS3の安定性が高いため、NS5bがより多く作られることが示された。JFH-1株感染細胞ではNS5bがより多く作られることによりRNA複製がより効率よく行われ、ウイルス複製とウイルスの産生も慢性肝炎株よりも効率よく行われることが示され

た。JFH-1株のNS3の遺伝子領域には慢性肝炎分離株と比べ21ヶ所の特異的なアミノ酸配列の変異がある。このアミノ酸変異がNS3の安定性に関与している可能性がある。また、NS2、NS3、NS4a、NS4b、NS5a、NS5bの非構造蛋白質は複合体を形成していることが示されている。このため、NS3以外の非構造蛋白質領域のアミノ酸変異もNS3の安定性の変化に関与している可能性がある。

【0099】以上の結果から、JFH-1株は慢性肝炎からの分離株と比べてコア、NS3、NS5a領域に変異が多く、特にコア領域の変異はコア蛋白質のプロセッシングに関係しており、P21とP23の発現パターンを変化させた。この変化によりウイルス粒子産生の変化が推測された。この変化に関与しているJFH-1株の配列はコア蛋白質のアミノ酸配列で161番目から191番目のなかの慢性肝炎と比べ4個のアミノ酸の変異であると考えられた。また、JFH-1株はNS5bの発現も慢性肝炎分離株より多く、RNA複製がより効率的に行われることが考えられた。このNS5bの発現の変

化にはNS3のアミノ酸の配列の変異が関与していると考えられた。これらの変異によるウイルスの性質の変化が劇症肝炎の病態に関係していると考えられた。

【0100】

【発明の効果】本発明が提供する全ゲノム配列を有する劇症肝炎患者から分離されたJFH-1株は、他の慢性肝炎患者から分離されたウイルス株とは異なった遺伝子情報を有することより、その病原性が異なっているものと考えられる。したがって、従来のHCV株が有する遺伝子情報と異なる、劇症肝炎患者から分離されたこのJFH-1株の遺伝子情報を利用することにより、新たなHCVウイルスの培養法の確立、感染性HVCのcDNAクローンの確立、HCVウイルスの病原性の相違を決定する遺伝子領域の探索、新たなHCVウイルスの遺伝子診断法の確立、更にはHCVウイルスによる劇症肝炎に対する治療方法の開発等を行うことが可能となる。

【0101】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

```
<:110>: TORAY INDUSTRIES, INC. : TOKYO METROPOLITAN ORGANIZATION FOR MEDICAL RESEARCH
<:120>: GENE OF HEPATITIS C VIRUS ISOLATED
        FROM A FULMINANT HEPATITIS PATIENT
<:130>: P00-0789
<:160>: 2
<:170>: PatentIn Ver. 2.1
<:210>: 1
<:211>: 9678
<:212>: DNA
<:213>: HUMAN BEING
<:220>:
<:221>: CDS
<:222>: (341)..(9439)
<:400>: 1
acctgcccct aatagggcgc acactccgcc atgaatcact cccctgtgag gaactactgt 60
cttcacgcag aaagcgccta gccatggcgt tagtatgagt gtcgtacagc ctccaggccc 120
ccccctcccg ggagagccat agtgggtctgc ggaaccggtg agtacaccgg aattgccggg 180

aagactgggt cctttcttgg ataaaccac tctatgcccg gccatttggg cgtgcccccg 240
caagactgct agccgagtag cgttgggttg cgaaggcct tgtggtactg cctgataggg 300
cgcttgcgag tgccccggga ggtctcgtag accgtgcacc atg agc aca aat cct 355
Met Ser Thr Asn Pro
1 5
aaa cct caa aga aaa acc aaa aga aac acc aac cgt cgc cca gaa gac 403
Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn Arg Arg Pro Glu Asp
10 15 20
gtt aag ttc ccg ggc ggc ggc cag atc gtt ggc gga gta tac ttg ttg 451
Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly Gly Val Tyr Leu Leu
```

25	30	35	
ccg cgc agg ggc ccc agg ttg ggt gtg cgc acg aca agg aaa act tcg	499		
Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Thr Thr Arg Lys Thr Ser			
40	45	50	
gag cgg tcc cag cca cgt ggg aga cgc cag ccc atc ccc aaa gat cgg	547		
Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro Ile Pro Lys Asp Arg			
55	60	65	
cgc tcc act ggc aag gcc tgg gga aaa cca ggt cgc ccc tgg ccc cta	595		
Arg Ser Thr Gly Lys Ala Trp Gly Lys Pro Gly Arg Pro Trp Pro Leu			
70	75	80	85
tat ggg aat gag gga ctc ggc tgg gca gga tgg ctc ctg tcc ccc cga	643		
Tyr Gly Asn Glu Gly Leu Gly Trp Ala Gly Trp Leu Leu Ser Pro Arg			
90	95	100	
ggc tct cgc ccc tcc tgg ggc ccc act gac ccc cgg cat agg tcg cgc	691		
Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp Pro Arg His Arg Ser Arg			
105	110	115	
aac gtg ggt aaa gtc atc gac acc cta acg tgt ggc ttt gcc gac ctc	739		
Asn Val Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu			
120	125	130	
atg ggg tac atc ccc gtc gta ggc gcc cgc ctt agt ggc gcc gcc aga	787		
Met Gly Tyr Ile Pro Val Val Gly Ala Pro Leu Ser Gly Ala Ala Arg			
135	140	145	
gct gtc gcg cac ggc gtg aga gtc ctg gag gac ggg gtt aat tat gca	835		
Ala Val Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp Gly Val Asn Tyr Ala			
150	155	160	165
aca ggg aac cta ccc ggt ttc ccc ttt tct atc ttc ttg ctg gcc ctg	883		
Thr Gly Asn Leu Pro Gly Phe Pro Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu			
170	175	180	
ttg tcc tgc atc acc gtt ccg gtc tct gct gcc cag gtg aag aat acc	931		
Leu Ser Cys Ile Thr Val Pro Val Ser Ala Ala Gln Val Lys Asn Thr			
185	190	195	
agt agc agc tac atg gtg acc aat gac tgc tcc aat gac agc atc act	979		
Ser Ser Ser Tyr Met Val Thr Asn Asp Cys Ser Asn Asp Ser Ile Thr			
200	205	210	
tgg cag ctc gag gct cgc gtt ctc cac gtc ccc ggg tgc gtc ccg tgc	1027		
Trp Gln Leu Glu Ala Ala Val Leu His Val Pro Gly Cys Val Pro Cys			
215	220	225	
gag aga gtg ggg aat acg tca cgg tgt tgg gtg cca gtc tcg cca aac	1075		
Glu Arg Val Gly Asn Thr Ser Arg Cys Trp Val Pro Val Ser Pro Asn			
230	235	240	245
atg gct gtg cgg cag ccc ggt gcc ctc acg cag ggt ctg cgg acg cac	1123		
Met Ala Val Arg Gln Pro Gly Ala Leu Thr Gln Gly Leu Arg Thr His			
250	255	260	
atc gat atg gtt gtg atg tcc gcc acc ttc tgc tct gct ctc tac gtg	1171		
Ile Asp Met Val Val Met Ser Ala Thr Phe Cys Ser Ala Leu Tyr Val			
265	270	275	
ggg gac ctc tgt ggc ggg gtg atg ctc gcg gcc cag gtg ttc atc gtc	1219		
Gly Asp Leu Cys Gly Gly Val Met Leu Ala Ala Gln Val Phe Ile Val			
280	285	290	
tcg ccg cag tac cac tgg ttt gtg caa gaa tgc aat tgc tcc atc tac	1267		

Ser	Pro	Gln	Tyr	His	Trp	Phe	Val	Gln	Glu	Cys	Asn	Cys	Ser	Ile	Tyr	
295						300				305						
cct	ggc	acc	atc	act	gga	cac	cgc	atg	gca	tgg	gac	atg	atg	atg	aac	1315
Pro	Gly	Thr	Ile	Thr	Gly	His	Arg	Met	Ala	Trp	Asp	Met	Met	Met	Asn	
310					315					320					325	
tgg	tgc	ccc	acg	gcc	acc	atg	atc	ctg	gcg	tac	gtg	atg	cgc	gtc	ccc	1363
Trp	Ser	Pro	Thr	Ala	Thr	Met	Ile	Leu	Ala	Tyr	Val	Met	Arg	Val	Pro	
				330					335				340			
gag	gtc	atc	ata	gac	atc	gtt	agc	ggg	gct	cac	tgg	ggc	gtc	atg	ttc	1411
Glu	Val	Ile	Ile	Asp	Ile	Val	Ser	Gly	Ala	His	Trp	Gly	Val	Met	Phe	
				345				350				355				
ggc	ttg	gcc	tac	ttc	tct	atg	cag	gga	gcg	tgg	gcg	aag	gtc	att	gtc	1459
Gly	Leu	Ala	Tyr	Phe	Ser	Met	Gln	Gly	Ala	Trp	Ala	Lys	Val	Ile	Val	
				360				365				370				
atc	ctt	ctg	ctg	gcc	gct	ggg	gtg	gac	gcg	ggc	acc	acc	acc	gtt	gga	1507
Ile	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Gly	Val	Asp	Ala	Gly	Thr	Thr	Thr	Val	Gly	
				375			380				385					
ggc	gct	gtt	gca	cgt	tcc	acc	aac	gtg	att	gcc	ggc	gtg	ttc	agc	cat	1555
Gly	Ala	Val	Ala	Arg	Ser	Thr	Asn	Val	Ile	Ala	Gly	Val	Phe	Ser	His	
390					395					400				405		
ggc	cct	cag	cag	aac	att	cag	ctc	att	aac	acc	aac	ggc	agt	tgg	cac	1603
Gly	Pro	Gln	Gln	Asn	Ile	Gln	Leu	Ile	Asn	Thr	Asn	Gly	Ser	Trp	His	
				410				415				420				
atc	aac	cgt	act	gcc	ttg	aat	tgc	aat	gac	tcc	ttg	aac	acc	ggc	ttt	1651
Ile	Asn	Arg	Thr	Ala	Leu	Asn	Cys	Asn	Asp	Ser	Leu	Asn	Thr	Gly	Phe	
				425				430				435				
ctc	gcg	gcc	ttg	ttc	tac	acc	aac	cgc	ttt	aac	tgc	tca	ggg	tgt	cca	1699
Leu	Ala	Ala	Leu	Phe	Tyr	Thr	Asn	Arg	Phe	Asn	Ser	Ser	Gly	Cys	Pro	
				440				445				450				
ggg	cgc	ctg	tcc	gcc	tgc	cgc	aac	atc	gag	gct	ttc	cgg	ata	ggg	tgg	1747
Gly	Arg	Leu	Ser	Ala	Cys	Arg	Asn	Ile	Glu	Ala	Phe	Arg	Ile	Gly	Trp	
				455			460				465					
ggc	acc	cta	cag	tac	gag	gat	aat	gtc	acc	aat	cca	gag	gat	atg	agg	1795
Gly	Thr	Leu	Gln	Tyr	Glu	Asp	Asn	Val	Thr	Asn	Pro	Glu	Asp	Met	Arg	
470					475					480				485		
ccg	tac	tgc	tgg	cac	tac	ccc	cca	aag	ccg	tgt	ggc	gta	gtc	ccc	gcg	1843
Pro	Tyr	Cys	Trp	His	Tyr	Pro	Pro	Lys	Pro	Cys	Gly	Val	Val	Pro	Ala	
				490					495			500				
agg	tct	gtg	tgt	ggc	cca	gtg	tac	tgt	ttc	acc	ccc	agc	ccg	gta	gta	1891
Arg	Ser	Val	Cys	Gly	Pro	Val	Tyr	Cys	Phe</							

Ser Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Ser Thr Gly Phe Thr Lys Thr	
550	555
560	565
tgt ggc gcg cca cct tgc cgc acc aga gct gac ttc aac gcc agc acg	2083
Cys Gly Ala Pro Pro Cys Arg Thr Arg Ala Asp Phe Asn Ala Ser Thr	
570	575
580	
gac ttg ttg tgc cct acg gat tgt ttt agg aag cat cct gat gcc act	2131
Asp Leu Leu Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Asp Ala Thr	
585	590
595	
tat att aag tgt ggt tct ggg ccc tgg ctc aca cca aag tgc ctg gtc	2179
Tyr Ile Lys Cys Gly Ser Gly Pro Trp Leu Thr Pro Lys Cys Leu Val	
600	605
610	
cac tac cct tac aga ctc tgg cat tac ccc tgc aca gtc aat ttt acc	2227
His Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Val Asn Phe Thr	
615	620
625	
atc ttc aag ata aga atg tat gta ggg ggg gtt gag cac agg ctc acg	2275
Ile Phe Lys Ile Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg Leu Thr	
630	635
640	645
gcc gca tgc aac ttc act cgt ggg gat cgc tgc gac ttg gag gac agg	2323
Ala Ala Cys Asn Phe Thr Arg Gly Asp Arg Cys Asp Leu Glu Asp Arg	
650	655
660	
gac agg agt cag ctg tct cct ctg ttg cac tot acc acg gaa tgg gcc	2371
Asp Arg Ser Gln Leu Ser Pro Leu Leu His Ser Thr Thr Glu Trp Ala	
665	670
675	
atc ctg ccc tgc acc tac tca gac tta ccc gct ttg tca act ggt ctt	2419
Ile Leu Pro Cys Thr Tyr Ser Asp Leu Pro Ala Leu Ser Thr Gly Leu	
680	685
690	
ctc cac ctt cac cag aac atc gtg gac gta caa tac atg tat ggc ctc	2467
Leu His Leu His Gln Asn Ile Val Asp Val Gln Tyr Met Tyr Gly Leu	
695	700
705	
tca cct gct atc aca aaa tac gtc gtt cga tgg gag tgg gtg gta ctc	2515
Ser Pro Ala Ile Thr Lys Tyr Val Val Arg Trp Glu Trp Val Val Leu	
710	715
720	725
tta ttc ctg ctc tta gcg gac gcc aga gtc tgc gcc tgc ttg tgg atg	2563
Leu Phe Leu Leu Leu Ala Asp Ala Arg Val Cys Ala Cys Leu Trp Met	
730	735
740	
ctc atc ttg ttg ggc cag gcc gaa gca gca ttg gag aag ttg gtc gtc	2611
Leu Ile Leu Leu Gly Gln Ala Glu Ala Ala Leu Glu Lys Leu Val Val	
745	750
755	
ttg cac gct gcg agt gcg gct aac tgc cat ggc ctc cta tat ttt gcc	2659
Leu His Ala Ala Ser Ala Ala Asn Cys His Gly Leu Leu Tyr Phe Ala	
760	765
770	
atc ttc ttc gtg gca gct tgg cac atc agg ggt cgg gtg gtc ccc ttg	2707
Ile Phe Phe Val Ala Ala Trp His Ile Arg Gly Arg Val Val Pro Leu	
775	780
785	
acc acc tat tgc ctc act ggc cta tgg ccc ttc tgc cta ctg ctc atg	2755
Thr Thr Tyr Cys Leu Thr Gly Leu Trp Pro Phe Cys Leu Leu Leu Met	
790	795
800	805
gca ctg ccc cgg cag gct tat gcc tat gac gca cct gtg cac gga cag	2803
Ala Leu Pro Arg Gln Ala Tyr Ala Tyr Asp Ala Pro Val His Gly Gln	

810	815	820	
ata ggc gtg ggt ttg ttg ata ttg atc acc ctc ttc aca ctc acc ccg	2851		
Ile Gly Val Gly Leu Leu Ile Leu Ile Thr Leu Phe Thr Leu Thr Pro			
825	830	835	
ggg tat aag acc ctc ctc ggc cag tgt ctg tgg tgg ttg tgc tat ctc	2899		
Gly Tyr Lys Thr Leu Leu Gly Gln Cys Leu Trp Trp Leu Cys Tyr Leu			
840	845	850	
ctg acc ctg ggc gaa gcc atg att cag gag tgg gta cca ccc atg cag	2947		
Leu Thr Leu Gly Glu Ala Met Ile Gln Glu Trp Val Pro Pro Met Gln			
855	860	865	
gtg cgc ggc ggc cgc gat ggc atc gcg tgg gcc gtc act ata ttc tgc	2995		
Val Arg Gly Gly Arg Asp Gly Ile Ala Trp Ala Val Thr Ile Phe Cys			
870	875	880	885
ccg ggt gtg gtg ttt gac att acc aaa tgg ctt ttg gcg ttg ctt ggg	3043		
Pro Gly Val Val Phe Asp Ile Thr Lys Trp Leu Leu Ala Leu Leu Gly			
890	895	900	
cct gct tac ctc tta agg gcc gct ttg aca cat gtg ccg tac ttc gtc	3091		
Pro Ala Tyr Leu Leu Arg Ala Ala Leu Thr His Val Pro Tyr Phe Val			
905	910	915	
aga gct cac gct ctg ata agg gta tgc gct ttg gtg aag cag ctc gcg	3139		
Arg Ala His Ala Leu Ile Arg Val Cys Ala Leu Val Lys Gln Leu Ala			
920	925	930	
ggg ggt agg tat gtt cag gtg gcg cta ttg gcc ctt ggc agg tgg act	3187		
Gly Gly Arg Tyr Val Gln Val Ala Leu Leu Ala Leu Gly Arg Trp Thr			
935	940	945	
ggc acc tac atc tat gac cac ctc aca cct atg tgc gac tgg gcc gct	3235		
Gly Thr Tyr Ile Tyr Asp His Leu Thr Pro Met Ser Asp Trp Ala Ala			
950	955	960	965
agc ggc ctg cgc gac tta gcg gtc gcc gtg gaa ccc atc atc ttc agt	3283		
Ser Gly Leu Arg Asp Leu Ala Val Ala Val Glu Pro Ile Ile Phe Ser			
970	975	980	
ccg atg gag aag aag gtc atc gtc tgg gga gcg gag acg gct gca tgt	3331		
Pro Met Glu Lys Lys Val Ile Val Trp Gly Ala Glu Thr Ala Ala Cys			
985	990	995	
ggg gac att cta cat gga ctt ccc gtg tcc gcc cga ctc ggc cag gag	3379		
Gly Asp Ile Leu His Gly Leu Pro Val Ser Ala Arg Leu Gly Gln Glu			
1000	1005	1010	
atc ctc ctc ggc cca gct gat ggc tac acc tcc aag ggg tgg aag ctc	3427		
Ile Leu Leu Gly Pro Ala Asp Gly Tyr Thr Ser Lys Gly Trp Lys Leu			
1015	1020	1025	
ctt gct ccc atc act gct tat gcc cag caa aca cga ggc ctc ctg ggc	3475		
Leu Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ala Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu Gly			
1030	1035	1040	1045
gcc ata gtg gtg agt atg acg ggg cgt gac agg aca gaa cag gcc ggg	3523		
Ala Ile Val Val Ser Met Thr Gly Arg Asp Arg Thr Glu Gln Ala Gly			
1050	1055	1060	
gaa gtc caa atc ctg tcc aca gtc tct cag tcc ttc ctc gga aca acc	3571		
Glu Val Gln Ile Leu Ser Thr Val Ser Gln Ser Phe Leu Gly Thr Thr			
1065	1070	1075	

atc tcg ggg gtt ttg tgg act gtt tac cac gga gct ggc aac aag act	3619
Ile Ser Gly Val Leu Trp Thr Val Tyr His Gly Ala Gly Asn Lys Thr	
1080 1085 1090	
cta gcc ggc tta cgg ggt cgg gtc acg cag atg tac tcg agt gct gag	3667
Leu Ala Gly Leu Arg Gly Pro Val Thr Gln Met Tyr Ser Ser Ala Glu	
1095 1100 1105	
ggg gac ttg gta ggc tgg ccc agc ccc cct ggg acc aag tct ttg gag	3715
Gly Asp Leu Val Gly Trp Pro Ser Pro Pro Gly Thr Lys Ser Leu Glu	
1110 1115 1120 1125	
ccg tgc aag tgt gga gcc gtc gac cta tat ctg gtc acg cgg aac gct	3763
Pro Cys Lys Cys Gly Ala Val Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg Asn Ala	
1130 1135 1140	
gat gtc atc ccg gct cgg aga cgc ggg gac aag cgg gga gca ttg ctc	3811
Asp Val Ile Pro Ala Arg Arg Arg Gly Asp Lys Arg Gly Ala Leu Leu	
1145 1150 1155	
tcc ccg aga ccc att tcg acc ttg aag ggg tcc tcg ggg ggg ccg gtg	3859
Ser Pro Arg Pro Ile Ser Thr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Val	
1160 1165 1170	
ctc tgc cct agg ggc cac gtc gtt ggg ctc ttc cga gca gct gtg tgc	3907
Leu Cys Pro Arg Gly His Val Val Gly Leu Phe Arg Ala Ala Val Cys	
1175 1180 1185	
tct cgg ggc gtg gcc aaa tcc atc gat ttc atc ccc gtt gag aca ctc	3955
Ser Arg Gly Val Ala Lys Ser Ile Asp Phe Ile Pro Val Glu Thr Leu	
1190 1195 1200 1205	
gac gtt gtt aca agg tct ccc act ttc agt gac aac agc acg cca ccg	4003
Asp Val Val Thr Arg Ser Pro Thr Phe Ser Asp Asn Ser Thr Pro Pro	
1210 1215 1220	
gct gtg ccc cag acc tat cag gtc ggg tac ttg cat gct cca act ggc	4051
Ala Val Pro Gln Thr Tyr Gln Val Gly Tyr Leu His Ala Pro Thr Gly	
1225 1230 1235	
agt gga aag agc acc aag gtc cct gtc gcg tat gcc gcc cag ggg tac	4099
Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Val Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr	
1240 1245 1250	
aaa gta cta gtg ctt aac ccc tcg gta gct gcc acc ctg ggg ttt ggg	4147
Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr Leu Gly Phe Gly	
1255 1260 1265	
gcg tac cta tcc aag gca cat ggc atc aat ccc aac att agg act gga	4195
Ala Tyr Leu Ser Lys Ala His Gly Ile Asn Pro Asn Ile Arg Thr Gly	
1270 1275 1280 1285	
gtc agg acc gtg atg acc ggg gag gcc atc acg tac tcc aca tat ggc	4243
Val Arg Thr Val Met Thr Gly Glu Ala Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly	
1290 1295 1300	
aaa ttt ctc gcc gat ggg ggc tgc gct agc ggc gcc tat gac atc atc	4291
Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ala Ser Gly Ala Tyr Asp Ile Ile	
1305 1310 1315	
ata tgc gat gaa tgc cac gct gtg gat gct acc tcc att ctc ggc atc	4339
Ile Cys Asp Glu Cys His Ala Val Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile	
1320 1325 1330	
gga acg gtc ctt gat caa gca gag aca gcc ggg gtc aga cta act gtg	4387

Gly	Thr	Val	Leu	Asp	Gln	Ala	Glu	Thr	Ala	Gly	Val	Arg	Leu	Thr	Val	
1335						1340					1345					
ctg	gct	acg	gcc	aca	ccc	ccc	ggg	tca	gtg	aca	acc	ccc	cat	ccc	gat	4435
Leu	Ala	Thr	Ala	Thr	Pro	Pro	Gly	Ser	Val	Thr	Thr	Pro	His	Pro	Asp	
1350					1355					1360				1365		
ata	gaa	gag	gta	ggc	ctc	ggg	cgg	gag	ggt	gag	atc	ccc	ttc	tat	ggg	4483
Ile	Glu	Glu	Val	Gly	Leu	Gly	Arg	Glu	Gly	Glu	Ile	Pro	Phe	Tyr	Gly	
				1370					1375				1380			
agg	gcg	att	ccc	cta	tcc	tgc	atc	aag	gga	ggg	aga	cac	ctg	att	ttc	4531
Arg	Ala	Ile	Pro	Leu	Ser	Cys	Ile	Lys	Gly	Gly	Arg	His	Leu	Ile	Phe	
				1385				1390				1395				
tgc	cac	tca	aag	aaa	aag	tgt	gac	gag	ctc	gcg	gcg	gcc	ctt	cgg	ggc	4579
Cys	His	Ser	Lys	Lys	Lys	Cys	Asp	Glu	Leu	Ala	Ala	Ala	Leu	Arg	Gly	
				1400				1405				1410				
atg	ggc	ttg	aat	gcc	gtg	gca	tac	tat	aga	ggg	ttg	gac	gtc	tcc	ata	4627
Met	Gly	Leu	Asn	Ala	Val	Ala	Tyr	Tyr	Arg	Gly	Leu	Asp	Val	Ser	Ile	
				1415				1420				1425				
ata	cca	gct	cag	gga	gat	gtg	gtg	gtc	gtc	gcc	acc	gac	gcc	ctc	atg	4675
Ile	Pro	Ala	Gln	Gly	Asp	Val	Val	Val	Val	Ala	Thr	Asp	Ala	Leu	Met	
1430				1435					1440				1445			
acg	ggg	tac	act	gga	gac	ttt	gac	tcc	gtg	atc	gac	tgc	aat	gta	gcg	4723
Thr	Gly	Tyr	Thr	Gly	Asp	Phe	Asp	Ser	Val	Ile	Asp	Cys	Asn	Val	Ala	
				1450				1455				1460				
gtc	acc	caa	gct	gtc	gac	ttc	agc	ctg	gac	ccc	acc	ttc	act	ata	acc	4771
Val	Thr	Gln	Ala	Val	Asp	Phe	Ser	Leu	Asp	Pro	Thr	Phe	Thr	Ile	Thr	
				1465				1470				1475				
aca	cag	act	gtc	cca	caa	gac	gct	gtc	tca	cgc	agt	cag	cgc	cgc	ggg	4819
Thr	Gln	Thr	Val	Pro	Gln	Asp	Ala	Val	Ser	Arg	Ser	Gln	Arg	Arg	Gly	
				1480				1485				1490				
cgc	aca	ggt	aga	gga	aga	cag	ggc	act	tat	agg	tat	gtt	tcc	act	ggt	4867
Arg	Thr	Gly	Arg	Gly	Arg	Gln	Gly	Thr	Tyr	Arg	Tyr	Val	Ser	Thr	Gly	
				1495				1500				1505				
gaa	cga	gcc	tca	gga	atg	ttt	gac	agt	gta	gtg	ctt	tgt	gag	tgc	tac	4915
Glu	Arg	Ala	Ser	Gly	Met	Phe	Asp	Ser	Val	Val	Leu	Cys	Glu	Cys	Tyr	
1510				1515					1520				1525			
gac	gca	ggg	gct	gcg	tgg	tac	gat	ctc	aca	cca	gcg	gag	acc	acc	gtc	4963
Asp	Ala	Gly	Ala	Ala	Trp	Tyr	Asp	Leu	Thr	Pro	Ala	Glu	Thr	Thr	Val	
				1530				1535				1540				
agg	ctt	aga	gcg	tat	ttc	aac										

1590	1595	1600	1605	
ccg tcc tgg gac gcc atg tgg aag tgc ctg gcc cga ctc aag cct acg				5203
Pro Ser Trp Asp Ala Met Trp Lys Cys Leu Ala Arg Leu Lys Pro Thr				
	1610	1615	1620	
ctt gcg ggc ccc aca cct ctc ctg tac cgt ttg ggc cct att acc aat				5251
Leu Ala Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Pro Ile Thr Asn				
	1625	1630	1635	
gag gtc acc ctc aca cac cct ggg acg aag tac atc gcc aca tgc atg				5299
Glu Val Thr Leu Thr His Pro Gly Thr Lys Tyr Ile Ala Thr Cys Met				
	1640	1645	1650	
caa gct gac ctt gag gtc atg acc agc acg tgg gtc cta gct gga gga				5347
Gln Ala Asp Leu Glu Val Met Thr Ser Thr Trp Val Leu Ala Gly Gly				
	1655	1660	1665	
gtc ctg gca gcc gtc gcc gca tat tgc ctg gcg act gga tgc gtt tcc				5395
Val Leu Ala Ala Val Ala Ala Tyr Cys Leu Ala Thr Gly Cys Val Ser				
1670	1675	1680	1685	
atc atc ggc cgc ttg cac gtc aac cag cga gtc gtc gtt gcg ccg gat				5443
Ile Ile Gly Arg Leu His Val Asn Gln Arg Val Val Val Ala Pro Asp				
	1690	1695	1700	
aag gag gtc ctg tat gag gct ttt gat gag atg gag gaa tgc gcc tct				5491
Lys Glu Val Leu Tyr Glu Ala Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys Ala Ser				
	1705	1710	1715	
agg gcg gct ctc atc gaa gag ggg cag cgg ata gcc gag atg ttg aag				5539
Arg Ala Ala Leu Ile Glu Glu Gly Gln Arg Ile Ala Glu Met Leu Lys				
	1720	1725	1730	
tcc aag atc caa ggc ttg ctg cag cag gcc tct aag cag gcc cag gac				5587
Ser Lys Ile Gln Gly Leu Leu Gln Gln Ala Ser Lys Gln Ala Gln Asp				
	1735	1740	1745	
ata caa ccc gct atg cag gct tca tgg ccc aaa gtg gaa caa ttt tgg				5635
Ile Gln Pro Ala Met Gln Ala Ser Trp Pro Lys Val Glu Gln Phe Trp				
1750	1755	1760	1765	
gcc aga cac atg tgg aac ttc att agc ggc atc caa tac ctc gca gga				5683
Ala Arg His Met Trp Asn Phe Ile Ser Gly Ile Gln Tyr Leu Ala Gly				
	1770	1775	1780	
ttg tca aca ctg cca ggg aac ccc gcg gtg gct tcc atg atg gca ttc				5731
Leu Ser Thr Leu Pro Gly Asn Pro Ala Val Ala Ser Met Met Ala Phe				
	1785	1790	1795	
agt gcc gcc ctc acc agt ccg ttg tgg acc agt acc acc atc ctt ctc				5779
Ser Ala Ala Leu Thr Ser Pro Leu Ser Thr Ser Thr Thr Ile Leu Leu				
	1800	1805	1810	
aac atc atg gga ggc tgg tta gcg tcc cag atc gca cca ccc gcg ggg				5827
Asn Ile Met Gly Gly Trp Leu Ala Ser Gln Ile Ala Pro Pro Ala Gly				
	1815	1820	1825	
gcc acc ggc ttt gtc gtc agt ggc ctg gtg ggg gct gcc gtg ggc agc				5875
Ala Thr Gly Phe Val Val Ser Gly Leu Val Gly Ala Ala Val Gly Ser				
1830	1835	1840	1845	
ata ggc ctg ggt aag gtg ctg gtg gac atc ctg gca gga tat ggt gcg				5923
Ile Gly Leu Gly Lys Val Leu Val Asp Ile Leu Ala Gly Tyr Gly Ala				

ggc att tcg ggg gcc ctc gtc gca ttc aag atc atg tct ggc gag aag	5971
Gly Ile Ser Gly Ala Leu Val Ala Phe Lys Ile Met Ser Gly Glu Lys	
ccc tct atg gaa gat gtc atc aat cta ctg cct ggg atc ctg tct ccg	6019
Pro Ser Met Glu Asp Val Ile Asn Leu Leu Pro Gly Ile Leu Ser Pro	
gga gcc ctg gtg gtg ggg gtc atc tgc gcg gcc att ctg cgc cgc cac	6067
Gly Ala Leu Val Val Gly Val Ile Cys Ala Ala Ile Leu Arg Arg His	
gtg gga ccg ggg gag ggc gcg gtc caa tgg atg aac agg ctt att gcc	6115
Val Gly Pro Gly Glu Gly Ala Val Gln Trp Met Asn Arg Leu Ile Ala	
ttt gct tcc aga gga aac cac gtc gcc cct act cac tac gtg acg gag	6163
Phe Ala Ser Arg Gly Asn His Val Ala Pro Thr His Tyr Val Thr Glu	
tcg gat gcg tcg cag cgt gtg acc caa cta ctt ggc tct ctt act ata	6211
Ser Asp Ala Ser Gln Arg Val Thr Gln Leu Leu Gly Ser Leu Thr Ile	
acc agc cta ctc aga aga ctc cac aat tgg ata act gag gac tgc ccc	6259
Thr Ser Leu Leu Arg Arg Leu His Asn Trp Ile Thr Glu Asp Cys Pro	
atc cca tgc tcc gga tcc tgg ctc cgc gac gtg tgg gac tgg gtt tgc	6307
Ile Pro Cys Ser Gly Ser Trp Leu Arg Asp Val Trp Asp Trp Val Cys	
acc atc ttg aca gac ttc aaa aat tgg ctg acc tct aaa ttg ttc ccc	6355
Thr Ile Leu Thr Asp Phe Lys Asn Trp Leu Thr Ser Lys Leu Phe Pro	
aag ctg ccc ggc ctc ccc ttc atc tct tgt caa aag ggg tac aag ggt	6403
Lys Leu Pro Gly Leu Pro Phe Ile Ser Cys Gln Lys Gly Tyr Lys Gly	
gtg tgg gcc ggc act ggc atc atg acc acg cgc tgc cct tgc ggc gcc	6451
Val Trp Ala Gly Thr Gly Ile Met Thr Thr Arg Cys Pro Cys Gly Ala	
aac atc tct ggc aat gtc cgc ctg ggc tct atg agg atc aca ggg cct	6499
Asn Ile Ser Gly Asn Val Arg Leu Gly Ser Met Arg Ile Thr Gly Pro	
aaa acc tgc atg aac acc tgg cag ggg acc ttt cct atc aat tgc tac	6547
Lys Thr Cys Met Asn Thr Trp Gln Gly Thr Phe Pro Ile Asn Cys Tyr	
acg gag ggc cag tgc gcg ccg aaa ccc ccc acg aac tac aag acc gcc	6595
Thr Glu Gly Gln Cys Ala Pro Lys Pro Pro Thr Asn Tyr Lys Thr Ala	
atc tgg agg gtg gcg gcc tcg gag tac gcg gag gtg acg cag cat ggg	6643
Ile Trp Arg Val Ala Ala Ser Glu Tyr Ala Glu Val Thr Gln His Gly	
tcg tac tcc tat gta aca gga ctg acc act gac aat ctg aaa att cct	6691
Ser Tyr Ser Tyr Val Thr Gly Leu Thr Thr Asp Asn Leu Lys Ile Pro	
tgc caa cta cct tct cca gag ttt ttc tcc tgg gtg gac ggt gtg cag	6739

Cys Gln Leu Pro Ser Pro Glu Phe Phe Ser Trp Val Asp Gly Val Gln	
2120 2125 2130	
atc cat agg ttt gca ccc aca cca aag ccg ttt ttc cgg gat gag gtc	6787
Ile His Arg Phe Ala Pro Thr Pro Lys Pro Phe Phe Arg Asp Glu Val	
2135 2140 2145	
tgc ttc tgc gtt ggg ctt aat tcc tat gct gtc ggg tcc cag ctt ccc	6835
Ser Phe Cys Val Gly Leu Asn Ser Tyr Ala Val Gly Ser Gln Leu Pro	
2150 2155 2160 2165	
tgt gaa cct gag ccc gac gca gac gta ttg agg tcc atg cta aca gat	6883
Cys Glu Pro Glu Pro Asp Ala Asp Val Leu Arg Ser Met Leu Thr Asp	
2170 2175 2180	
ccg ccc cac atc acg gcg gag act gcg gcg cgg cgc ttg gca cgg gga	6931
Pro Pro His Ile Thr Ala Glu Thr Ala Ala Arg Arg Leu Ala Arg Gly	
2185 2190 2195	
tca cct cca tct gag gcg agc tcc tca gtg agc cag cta tca gca ccg	6979
Ser Pro Pro Ser Glu Ala Ser Ser Ser Val Ser Gln Leu Ser Ala Pro	
2200 2205 2210	
tgc ctg cgg gcc acc tgc acc acc cac agc aac acc tat gac gtg gac	7027
Ser Leu Arg Ala Thr Cys Thr Thr His Ser Asn Thr Tyr Asp Val Asp	
2215 2220 2225	
atg gtc gat gcc aac ctg ctc atg gag ggc ggt gtg gct cag aca gag	7075
Met Val Asp Ala Asn Leu Leu Met Glu Gly Gly Val Ala Gln Thr Glu	
2230 2235 2240 2245	
cct gag tcc agg gtg ccc gtt ctg gac ttt ctc gag cca atg gcc gag	7123
Pro Glu Ser Arg Val Pro Val Leu Asp Phe Leu Glu Pro Met Ala Glu	
2250 2255 2260	
gaa gag agc gac ctt gag ccc tca ata cca tcg gag tgc atg ctc ccc	7171
Glu Glu Ser Asp Leu Glu Pro Ser Ile Pro Ser Glu Cys Met Leu Pro	
2265 2270 2275	
agg agc ggg ttt cca cgg gcc tta ccg gct tgg gca cgg cct gac tac	7219
Arg Ser Gly Phe Pro Arg Ala Leu Pro Ala Trp Ala Arg Pro Asp Tyr	
2280 2285 2290	
aac ccg ccg ctc gtg gaa tcg tgg agg agg cca gat tac caa ccg ccc	7267
Asn Pro Pro Leu Val Glu Ser Trp Arg Arg Pro Asp Tyr Gln Pro Pro	
2295 2300 2305	
acc gtt gct ggt tgt gct ctc ccc ccc ccc aag aag gcc ccg acg cct	7315
Thr Val Ala Gly Cys Ala Leu Pro Pro Pro Lys Lys Ala Pro Thr Pro	
2310 2315 2320 2325	
ccc cca agg aga cgc cgg aca gtg ggt ctg agc gag agc acc ata tca	7363
Pro Pro Arg Arg Arg Arg Thr Val Gly Leu Ser Glu Ser Thr Ile Ser	
2330 2335 2340	
gaa gcc ctc cag caa ctg gcc atc aag acc ttt ggc cag ccc ccc tcg	7411
Glu Ala Leu Gln Gln Leu Ala Ile Lys Thr Phe Gly Gln Pro Pro Ser	
2345 2350 2355	
agc ggt gat gca ggc tcg tcc acg ggg gcg ggc gcc gcc gaa tcc gcc	7459
Ser Gly Asp Ala Gly Ser Ser Thr Gly Ala Gly Ala Ala Glu Ser Gly	
2360 2365 2370	
ggt ccg acg tcc cct ggt gag ccg gcc ccc tca gag aca ggt tcc gcc	7507

Gly	Pro	Thr	Ser	Pro	Gly	Glu	Pro	Ala	Pro	Ser	Glu	Thr	Gly	Ser	Ala	
2375							2380				2385					
tcc	tct	atg	ccc	ccc	ctc	gag	ggg	gag	cct	gga	gat	ccg	gac	ctg	gag	7555
Ser	Ser	Met	Pro	Pro	Leu	Glu	Gly	Glu	Pro	Gly	Asp	Pro	Asp	Leu	Glu	
2390						2395				2400				2405		
tct	gat	cag	gta	gag	ctt	caa	cct	ccc	ccc	cag	ggg	ggg	ggg	gta	gct	7603
Ser	Asp	Gln	Val	Glu	Leu	Gln	Pro	Pro	Pro	Gln	Gly	Gly	Gly	Val	Ala	
				2410					2415					2420		
ccc	ggt	tcg	ggc	tcg	ggg	tct	tgg	tct	act	tgc	tcc	gag	gag	gac	gat	7651
Pro	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Trp	Ser	Thr	Cys	Ser	Glu	Glu	Asp	Asp	
				2425					2430					2435		
acc	acc	gtg	tgc	tgc	tcc	atg	tca	tac	tcc	tgg	acc	ggg	gct	cta	ata	7699
Thr	Thr	Val	Cys	Cys	Ser	Met	Ser	Tyr	Ser	Trp	Thr	Gly	Ala	Leu	Ile	
				2440					2445					2450		
act	ccc	tgt	agc	ccc	gaa	gag	gaa	aag	ttg	cca	atc	aac	cct	ttg	agt	7747
Thr	Pro	Cys	Ser	Pro	Glu	Glu	Glu	Lys	Leu	Pro	Ile	Asn	Pro	Leu	Ser	
				2455					2460					2465		
aac	tcg	ctg	ttg	cga	tac	cat	aac	aag	gtg	tac	tgt	aca	aca	tca	aag	7795
Asn	Ser	Leu	Leu	Arg	Tyr	His	Asn	Lys	Val	Tyr	Cys	Thr	Thr	Ser	Lys	
2470				2475					2480					2485		
agc	gcc	tca	cag	agg	gct	aaa	aag	gta	act	ttt	gac	agg	acg	caa	gtg	7843
Ser	Ala	Ser	Gln	Arg	Ala	Lys	Lys	Val	Thr	Phe	Asp	Arg	Thr	Gln	Val	
				2490					2495					2500		
ctc	gac	gcc	cat	tat	gac	tca	gtc	tta	aag	gac	atc	aag	cta	gcg	gct	7891
Leu	Asp	Ala	His	Tyr	Asp	Ser	Val	Leu	Lys	Asp	Ile	Lys	Leu	Ala	Ala	
				2505					2510					2515		
tcc	aag	gtc	agc	gca	agg	ctc	ctc	acc	ttg	gag	gag	gcg	tgc	cag	ttg	7939
Ser	Lys	Val	Ser	Ala	Arg	Leu	Leu	Thr	Leu	Glu	Glu	Ala	Cys	Gln	Leu	
				2520					2525					2530		
act	cca	ccc	cat	tct	gca	aga	tcc	aag	tat	gga	ttc	ggg	gcc	aag	gag	7987
Thr	Pro	Pro	His	Ser	Ala	Arg	Ser	Lys	Tyr	Gly	Phe	Gly	Ala	Lys	Glu	
				2535					2540					2545		
gtc	cgc	agc	ttg	tcc	ggg	agg	gcc	gtt	aac	cac	atc	aag	tcc	gtg	tgg	8035
Val	Arg	Ser	Leu	Ser	Gly	Arg	Ala	Val	Asn	His	Ile	Lys	Ser	Val	Trp	
2550				2555					2560					2565		
aag	gac	ctc	ctg	gaa	gac	cca	caa	aca	cca	att	ccc	aca	acc	atc	atg	8083
Lys	Asp	Leu	Leu	Glu	Asp	Pro	Gln	Thr	Pro	Ile	Pro	Thr	Thr	Ile	Met	
				2570					2575					2580		
gcc	aaa	aat	gag	gtg	ttc	tgc	gtg	gac	ccc	gcc	aag	ggg	ggt	aag	aaa	8131
Ala	Lys	Asn	Glu	Val	P											

```

ctc ttg aaa gca tgg gcg gaa aag aag gac ccc atg ggt ttt tcg tat 8323
Leu Leu Lys Ala Trp Ala Glu Lys Lys Asp Pro Met Gly Phe Ser Tyr
      2650      2655      2660
gat acc cga tgc ttc gac tca acc gtc act gag aga gac atc agg acc 8371
Asp Thr Arg Cys Phe Asp Ser Thr Val Thr Glu Arg Asp Ile Arg Thr
      2665      2670      2675
gag gag tcc ata tac cag gcc tgc tcc ctg ccc gag gag gcc cgc act 8419
Glu Glu Ser Ile Tyr Gln Ala Cys Ser Leu Pro Glu Glu Ala Arg Thr
      2680      2685      2690
gcc ata cac tcg ctg act gag aga ctt tac gta gga ggg ccc atg ttc 8467
Ala Ile His Ser Leu Thr Glu Arg Leu Tyr Val Gly Gly Pro Met Phe
      2695      2700      2705
aac agc aag ggt caa acc tgc ggt tac aga cgt tgc cgc gcc agc ggg 8515
Asn Ser Lys Gly Gln Thr Cys Gly Tyr Arg Arg Cys Arg Ala Ser Gly
2710      2715      2720      2725
gtg cta acc act agc atg ggt aac acc atc aca tgc tat gtg aaa gcc 8563
Val Leu Thr Thr Ser Met Gly Asn Thr Ile Thr Cys Tyr Val Lys Ala
      2730      2735      2740
cta gcg gcc tgc aag gct gcg ggg ata gtt gcg ccc aca atg ctg gta 8611
Leu Ala Ala Cys Lys Ala Ala Gly Ile Val Ala Pro Thr Met Leu Val
      2745      2750      2755

tgc ggc gat gac cta gta gtc atc tca gaa agc cag ggg act gag gag 8659
Cys Gly Asp Asp Leu Val Val Ile Ser Glu Ser Gln Gly Thr Glu Glu
      2760      2765      2770
gac gag cgg aac ctg aga gcc ttc acg gag gcc atg acc agg tac tct 8707
Asp Glu Arg Asn Leu Arg Ala Phe Thr Glu Ala Met Thr Arg Tyr Ser
      2775      2780      2785
gcc cct cct ggt gat ccc ccc aga ccg gaa tat gac ctg gag cta ata 8755
Ala Pro Pro Gly Asp Pro Pro Arg Pro Glu Tyr Asp Leu Glu Leu Ile
2790      2795      2800      2805
aca tcc tgt tcc tca aat gtg tct gtg gcg ttg ggc ccg cgg ggc cgc 8803
Thr Ser Cys Ser Ser Asn Val Ser Val Ala Leu Gly Pro Arg Gly Arg
      2810      2815      2820
cgc aga tac tac ctg acc aga gac cca acc act cca ctc gcc cgg gct 8851
Arg Arg Tyr Tyr Leu Thr Arg Asp Pro Thr Thr Pro Leu Ala Arg Ala
      2825      2830      2835
gcc tgg gaa aca gtt aga cac tcc cct atc aat tca tgg ctg gga aac 8899
Ala Trp Glu Thr Val Arg His Ser Pro Ile Asn Ser Trp Leu Gly Asn
      2840      2845      2850
atc atc cag tat gct cca acc ata tgg gtt cgc atg gtc cta atg aca 8947
Ile Ile Gln Tyr Ala Pro Thr Ile Trp Val Arg Met Val Leu Met Thr
      2855      2860      2865
cac ttc ttc tcc att ctc atg gtc caa gac acc ctg gac cag aac ctc 8995
His Phe Phe Ser Ile Leu Met Val Gln Asp Thr Leu Asp Gln Asn Leu
2870      2875      2880      2885
aac ttt gag atg tat gga tca gta tac tcc gtg aat cct ttg gac ctt 9043
Asn Phe Glu Met Tyr Gly Ser Val Tyr Ser Val Asn Pro Leu Asp Leu
      2890      2895      2900

```

```

cca gcc ata att gag agg tta cac ggg ctt gac gcc ttt tct atg cac 9091
Pro Ala Ile Ile Glu Arg Leu His Gly Leu Asp Ala Phe Ser Met His
      2905      2910      2915
aca tac tct cac cac gaa ctg acg cgg gtg gct tca gcc ctc aga aaa 9139
Thr Tyr Ser His His Glu Leu Thr Arg Val Ala Ser Ala Leu Arg Lys
      2920      2925      2930
ctt ggg gcg cca ccc ctc agg gtg tgg aag agt cgg gct cgc gca gtc 9187
Leu Gly Ala Pro Pro Leu Arg Val Trp Lys Ser Arg Ala Arg Ala Val
      2935      2940      2945
agg gcg tcc ctc atc tcc cgt gga ggg aaa gcg gcc gtt tgc ggc cga 9235
Arg Ala Ser Leu Ile Ser Arg Gly Gly Lys Ala Ala Val Cys Gly Arg
      2950      2955      2960      2965
tat ctc ttc aat tgg gcg gtg aag acc aag ctc aaa ctc act cca ttg 9283
Tyr Leu Phe Asn Trp Ala Val Lys Thr Lys Leu Lys Leu Thr Pro Leu
      2970      2975      2980
ccg gag gcg cgc cta ctg gac tta tcc agt tgg ttc acc gtc ggc gcc 9331
Pro Glu Ala Arg Leu Leu Asp Leu Ser Ser Trp Phe Thr Val Gly Ala
      2985      2990      2995
ggc ggg ggc gac att ttt cac agc gtg tgg cgc gcc cga ccc cgc tca 9379
Gly Gly Gly Asp Ile Phe His Ser Val Ser Arg Ala Arg Pro Arg Ser
      3000      3005      3010
tta ctc ttc ggc cta ctc cta ctt ttc gta ggg gta ggc ctc ttc cta 9427
Leu Leu Phe Gly Leu Leu Leu Leu Phe Val Gly Val Gly Leu Phe Leu
      3015      3020      3025
ctc ccc gct cgg tagagcggca cacactaggt acactccata gctaactgtt 9479
Leu Pro Ala Arg
3030
cctttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttctttt tttttttttt 9539
ccctctttct tccctttctc tcttattcta ctttctttct tgggtgctcc atcttagccc 9599
tagtcacggc tagctgtgaa aggtccgtga gccgcatgac tgcagagagt gccgtaactg 9659
gtctctctgc agatcatgt 9678
<:210>: 2
<:211>: 3033
<:212>: PRT
<:213>: HUMAN BEING
<:400>: 2
Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn
  1          5          10          15
Arg Arg Pro Glu Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly
      20      25      30
Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Thr
      35      40      45
Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro
      50      55      60
Ile Pro Lys Asp Arg Arg Ser Thr Gly Lys Ala Trp Gly Lys Pro Gly
      65      70      75      80
Arg Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Glu Gly Leu Gly Trp Ala Gly Trp
      85      90      95
Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp Pro
      100      105      110

```

Arg His Arg Ser Arg Asn Val Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys
 115 120 125
 Gly Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile Pro Val Val Gly Ala Pro Leu
 130 135 140
 Ser Gly Ala Ala Arg Ala Val Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp
 145 150 155 160

 Gly Val Asn Tyr Ala Thr Gly Asn Leu Pro Gly Phe Pro Phe Ser Ile
 165 170 175
 Phe Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Ile Thr Val Pro Val Ser Ala Ala
 180 185 190
 Gln Val Lys Asn Thr Ser Ser Ser Tyr Met Val Thr Asn Asp Cys Ser
 195 200 205
 Asn Asp Ser Ile Thr Trp Gln Leu Glu Ala Ala Val Leu His Val Pro
 210 215 220
 Gly Cys Val Pro Cys Glu Arg Val Gly Asn Thr Ser Arg Cys Trp Val
 225 230 235 240
 Pro Val Ser Pro Asn Met Ala Val Arg Gln Pro Gly Ala Leu Thr Gln
 245 250 255
 Gly Leu Arg Thr His Ile Asp Met Val Val Met Ser Ala Thr Phe Cys
 260 265 270
 Ser Ala Leu Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly Gly Val Met Leu Ala Ala
 275 280 285
 Gln Val Phe Ile Val Ser Pro Gln Tyr His Trp Phe Val Gln Glu Cys
 290 295 300
 Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly Thr Ile Thr Gly His Arg Met Ala Trp
 305 310 315 320
 Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Ala Thr Met Ile Leu Ala Tyr
 325 330 335
 Val Met Arg Val Pro Glu Val Ile Ile Asp Ile Val Ser Gly Ala His
 340 345 350
 Trp Gly Val Met Phe Gly Leu Ala Tyr Phe Ser Met Gln Gly Ala Trp
 355 360 365
 Ala Lys Val Ile Val Ile Leu Leu Leu Ala Ala Gly Val Asp Ala Gly
 370 375 380
 Thr Thr Thr Val Gly Gly Ala Val Ala Arg Ser Thr Asn Val Ile Ala
 385 390 395 400
 Gly Val Phe Ser His Gly Pro Gln Gln Asn Ile Gln Leu Ile Asn Thr
 405 410 415
 Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Arg Thr Ala Leu Asn Cys Asn Asp Ser
 420 425 430
 Leu Asn Thr Gly Phe Leu Ala Ala Leu Phe Tyr Thr Asn Arg Phe Asn
 435 440 445
 Ser Ser Gly Cys Pro Gly Arg Leu Ser Ala Cys Arg Asn Ile Glu Ala
 450 455 460

 Phe Arg Ile Gly Trp Gly Thr Leu Gln Tyr Glu Asp Asn Val Thr Asn
 465 470 475 480
 Pro Glu Asp Met Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Pro Pro Lys Pro Cys
 485 490 495

Gly Val Val Pro Ala Arg Ser Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr
 500 505 510
 Pro Ser Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Arg Gly Val Pro Thr
 515 520 525
 Tyr Thr Trp Gly Glu Asn Glu Thr Asp Val Phe Leu Leu Asn Ser Thr
 530 535 540
 Arg Pro Pro Gln Gly Ser Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Ser Thr
 545 550 555 560
 Gly Phe Thr Lys Thr Cys Gly Ala Pro Pro Cys Arg Thr Arg Ala Asp
 565 570 575
 Phe Asn Ala Ser Thr Asp Leu Leu Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys
 580 585 590
 His Pro Asp Ala Thr Tyr Ile Lys Cys Gly Ser Gly Pro Trp Leu Thr
 595 600 605
 Pro Lys Cys Leu Val His Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys
 610 615 620

 Thr Val Asn Phe Thr Ile Phe Lys Ile Arg Met Tyr Val Gly Gly Val
 625 630 635 640
 Glu His Arg Leu Thr Ala Ala Cys Asn Phe Thr Arg Gly Asp Arg Cys
 645 650 655
 Asp Leu Glu Asp Arg Asp Arg Ser Gln Leu Ser Pro Leu Leu His Ser
 660 665 670
 Thr Thr Glu Trp Ala Ile Leu Pro Cys Thr Tyr Ser Asp Leu Pro Ala
 675 680 685
 Leu Ser Thr Gly Leu Leu His Leu His Gln Asn Ile Val Asp Val Gln
 690 695 700
 Tyr Met Tyr Gly Leu Ser Pro Ala Ile Thr Lys Tyr Val Val Arg Trp
 705 710 715 720
 Glu Trp Val Val Leu Leu Phe Leu Leu Leu Ala Asp Ala Arg Val Cys
 725 730 735
 Ala Cys Leu Trp Met Leu Ile Leu Leu Gly Gln Ala Glu Ala Ala Leu
 740 745 750
 Glu Lys Leu Val Val Leu His Ala Ala Ser Ala Ala Asn Cys His Gly
 755 760 765
 Leu Leu Tyr Phe Ala Ile Phe Phe Val Ala Ala Trp His Ile Arg Gly
 770 775 780
 Arg Val Val Pro Leu Thr Thr Tyr Cys Leu Thr Gly Leu Trp Pro Phe
 785 790 795 800
 Cys Leu Leu Leu Met Ala Leu Pro Arg Gln Ala Tyr Ala Tyr Asp Ala
 805 810 815
 Pro Val His Gly Gln Ile Gly Val Gly Leu Leu Ile Leu Ile Thr Leu
 820 825 830
 Phe Thr Leu Thr Pro Gly Tyr Lys Thr Leu Leu Gly Gln Cys Leu Trp
 835 840 845
 Trp Leu Cys Tyr Leu Leu Thr Leu Gly Glu Ala Met Ile Gln Glu Trp
 850 855 860
 Val Pro Pro Met Gln Val Arg Gly Gly Arg Asp Gly Ile Ala Trp Ala
 865 870 875 880
 Val Thr Ile Phe Cys Pro Gly Val Val Phe Asp Ile Thr Lys Trp Leu

885 890 895
 Leu Ala Leu Leu Gly Pro Ala Tyr Leu Leu Arg Ala Ala Leu Thr His
 900 905 910
 Val Pro Tyr Phe Val Arg Ala His Ala Leu Ile Arg Val Cys Ala Leu
 915 920 925

 Val Lys Gln Leu Ala Gly Gly Arg Tyr Val Gln Val Ala Leu Leu Ala
 930 935 940
 Leu Gly Arg Trp Thr Gly Thr Tyr Ile Tyr Asp His Leu Thr Pro Met
 945 950 955 960
 Ser Asp Trp Ala Ala Ser Gly Leu Arg Asp Leu Ala Val Ala Val Glu
 965 970 975
 Pro Ile Ile Phe Ser Pro Met Glu Lys Lys Val Ile Val Trp Gly Ala
 980 985 990
 Glu Thr Ala Ala Cys Gly Asp Ile Leu His Gly Leu Pro Val Ser Ala
 995 1000 1005
 Arg Leu Gly Gln Glu Ile Leu Leu Gly Pro Ala Asp Gly Tyr Thr Ser
 1010 1015 1020
 Lys Gly Trp Lys Leu Leu Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ala Gln Gln Thr
 1025 1030 1035 1040
 Arg Gly Leu Leu Gly Ala Ile Val Val Ser Met Thr Gly Arg Asp Arg
 1045 1050 1055
 Thr Glu Gln Ala Gly Glu Val Gln Ile Leu Ser Thr Val Ser Gln Ser
 1060 1065 1070
 Phe Leu Gly Thr Thr Ile Ser Gly Val Leu Trp Thr Val Tyr His Gly
 1075 1080 1085

 Ala Gly Asn Lys Thr Leu Ala Gly Leu Arg Gly Pro Val Thr Gln Met
 1090 1095 1100
 Tyr Ser Ser Ala Glu Gly Asp Leu Val Gly Trp Pro Ser Pro Pro Gly
 1105 1110 1115 1120
 Thr Lys Ser Leu Glu Pro Cys Lys Cys Gly Ala Val Asp Leu Tyr Leu
 1125 1130 1135
 Val Thr Arg Asn Ala Asp Val Ile Pro Ala Arg Arg Arg Gly Asp Lys
 1140 1145 1150
 Arg Gly Ala Leu Leu Ser Pro Arg Pro Ile Ser Thr Leu Lys Gly Ser
 1155 1160 1165
 Ser Gly Gly Pro Val Leu Cys Pro Arg Gly His Val Val Gly Leu Phe
 1170 1175 1180
 Arg Ala Ala Val Cys Ser Arg Gly Val Ala Lys Ser Ile Asp Phe Ile
 1185 1190 1195 1200
 Pro Val Glu Thr Leu Asp Val Val Thr Arg Ser Pro Thr Phe Ser Asp
 1205 1210 1215
 Asn Ser Thr Pro Pro Ala Val Pro Gln Thr Tyr Gln Val Gly Tyr Leu
 1220 1225 1230
 His Ala Pro Thr Gly Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Val Ala Tyr
 1235 1240 1245
 Ala Ala Gln Gly Tyr Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala
 1250 1255 1260
 Thr Leu Gly Phe Gly Ala Tyr Leu Ser Lys Ala His Gly Ile Asn Pro

1265 1270 1275 1280
 Asn Ile Arg Thr Gly Val Arg Thr Val Met Thr Gly Glu Ala Ile Thr
 1285 1290 1295
 Tyr Ser Thr Tyr Gly Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ala Ser Gly
 1300 1305 1310
 Ala Tyr Asp Ile Ile Ile Cys Asp Glu Cys His Ala Val Asp Ala Thr
 1315 1320 1325
 Ser Ile Leu Gly Ile Gly Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly
 1330 1335 1340
 Val Arg Leu Thr Val Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr
 1345 1350 1355 1360
 Thr Pro His Pro Asp Ile Glu Glu Val Gly Leu Gly Arg Glu Gly Glu
 1365 1370 1375
 Ile Pro Phe Tyr Gly Arg Ala Ile Pro Leu Ser Cys Ile Lys Gly Gly
 1380 1385 1390

 Arg His Leu Ile Phe Cys His Ser Lys Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala
 1395 1400 1405
 Ala Ala Leu Arg Gly Met Gly Leu Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly
 1410 1415 1420
 Leu Asp Val Ser Ile Ile Pro Ala Gln Gly Asp Val Val Val Val Ala
 1425 1430 1435 1440
 Thr Asp Ala Leu Met Thr Gly Tyr Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile
 1445 1450 1455
 Asp Cys Asn Val Ala Val Thr Gln Ala Val Asp Phe Ser Leu Asp Pro
 1460 1465 1470
 Thr Phe Thr Ile Thr Thr Gln Thr Val Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg
 1475 1480 1485
 Ser Gln Arg Arg Gly Arg Thr Gly Arg Gly Arg Gln Gly Thr Tyr Arg
 1490 1495 1500
 Tyr Val Ser Thr Gly Glu Arg Ala Ser Gly Met Phe Asp Ser Val Val
 1505 1510 1515 1520
 Leu Cys Glu Cys Tyr Asp Ala Gly Ala Ala Trp Tyr Asp Leu Thr Pro
 1525 1530 1535
 Ala Glu Thr Thr Val Arg Leu Arg Ala Tyr Phe Asn Thr Pro Gly Leu
 1540 1545 1550

 Pro Val Cys Gln Asp His Leu Glu Phe Trp Glu Ala Val Phe Thr Gly
 1555 1560 1565
 Leu Thr His Ile Asp Ala His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ala Gly
 1570 1575 1580
 Glu Asn Phe Ala Tyr Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg
 1585 1590 1595 1600
 Ala Lys Ala Pro Pro Pro Ser Trp Asp Ala Met Trp Lys Cys Leu Ala
 1605 1610 1615
 Arg Leu Lys Pro Thr Leu Ala Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu
 1620 1625 1630
 Gly Pro Ile Thr Asn Glu Val Thr Leu Thr His Pro Gly Thr Lys Tyr
 1635 1640 1645
 Ile Ala Thr Cys Met Gln Ala Asp Leu Glu Val Met Thr Ser Thr Trp

1650	1655	1660
Val Leu Ala Gly Gly Val Leu Ala Ala Val Ala Ala Tyr Cys Leu Ala		
1665	1670	1675
Thr Gly Cys Val Ser Ile Ile Gly Arg Leu His Val Asn Gln Arg Val		1680
	1685	1690
Val Val Ala Pro Asp Lys Glu Val Leu Tyr Glu Ala Phe Asp Glu Met		1695
	1700	1705
Glu Glu Cys Ala Ser Arg Ala Ala Leu Ile Glu Glu Gly Gln Arg Ile		1710
	1715	1720
Ala Glu Met Leu Lys Ser Lys Ile Gln Gly Leu Leu Gln Gln Ala Ser		1725
	1730	1735
Lys Gln Ala Gln Asp Ile Gln Pro Ala Met Gln Ala Ser Trp Pro Lys		1740
1745	1750	1755
Val Glu Gln Phe Trp Ala Arg His Met Trp Asn Phe Ile Ser Gly Ile		1760
	1765	1770
Gln Tyr Leu Ala Gly Leu Ser Thr Leu Pro Gly Asn Pro Ala Val Ala		1775
	1780	1785
Ser Met Met Ala Phe Ser Ala Ala Leu Thr Ser Pro Leu Ser Thr Ser		1790
	1795	1800
Thr Thr Ile Leu Leu Asn Ile Met Gly Gly Trp Leu Ala Ser Gln Ile		1805
	1810	1815
Ala Pro Pro Ala Gly Ala Thr Gly Phe Val Val Ser Gly Leu Val Gly		1820
1825	1830	1835
Ala Ala Val Gly Ser Ile Gly Leu Gly Lys Val Leu Val Asp Ile Leu		1840
	1845	1850
		1855
Ala Gly Tyr Gly Ala Gly Ile Ser Gly Ala Leu Val Ala Phe Lys Ile		
	1860	1865
Met Ser Gly Glu Lys Pro Ser Met Glu Asp Val Ile Asn Leu Leu Pro		1870
	1875	1880
Gly Ile Leu Ser Pro Gly Ala Leu Val Val Gly Val Ile Cys Ala Ala		1885
	1890	1895
Ile Leu Arg Arg His Val Gly Pro Gly Glu Gly Ala Val Gln Trp Met		1900
1905	1910	1915
Asn Arg Leu Ile Ala Phe Ala Ser Arg Gly Asn His Val Ala Pro Thr		1920
	1925	1930
His Tyr Val Thr Glu Ser Asp Ala Ser Gln Arg Val Thr Gln Leu Leu		1935
	1940	1945
Gly Ser Leu Thr Ile Thr Ser Leu Leu Arg Arg Leu His Asn Trp Ile		1950
	1955	1960
Thr Glu Asp Cys Pro Ile Pro Cys Ser Gly Ser Trp Leu Arg Asp Val		1965
	1970	1975
Trp Asp Trp Val Cys Thr Ile Leu Thr Asp Phe Lys Asn Trp Leu Thr		1980
1985	1990	1995
Ser Lys Leu Phe Pro Lys Leu Pro Gly Leu Pro Phe Ile Ser Cys Gln		2000
	2005	2010
		2015
Lys Gly Tyr Lys Gly Val Trp Ala Gly Thr Gly Ile Met Thr Thr Arg		
	2020	2025
		2030
Cys Pro Cys Gly Ala Asn Ile Ser Gly Asn Val Arg Leu Gly Ser Met		

2035	2040	2045
Arg Ile Thr Gly Pro Lys Thr Cys Met Asn Thr Trp Gln Gly Thr Phe		
2050	2055	2060
Pro Ile Asn Cys Tyr Thr Glu Gly Gln Cys Ala Pro Lys Pro Pro Thr		
2065	2070	2075
Asn Tyr Lys Thr Ala Ile Trp Arg Val Ala Ala Ser Glu Tyr Ala Glu		2080
2085	2090	2095
Val Thr Gln His Gly Ser Tyr Ser Tyr Val Thr Gly Leu Thr Thr Asp		
2100	2105	2110
Asn Leu Lys Ile Pro Cys Gln Leu Pro Ser Pro Glu Phe Phe Ser Trp		
2115	2120	2125
Val Asp Gly Val Gln Ile His Arg Phe Ala Pro Thr Pro Lys Pro Phe		
2130	2135	2140
Phe Arg Asp Glu Val Ser Phe Cys Val Gly Leu Asn Ser Tyr Ala Val		
2145	2150	2155
Gly Ser Gln Leu Pro Cys Glu Pro Glu Pro Asp Ala Asp Val Leu Arg		2160
2165	2170	2175
Ser Met Leu Thr Asp Pro Pro His Ile Thr Ala Glu Thr Ala Ala Arg		
2180	2185	2190
Arg Leu Ala Arg Gly Ser Pro Pro Ser Glu Ala Ser Ser Ser Val Ser		
2195	2200	2205
Gln Leu Ser Ala Pro Ser Leu Arg Ala Thr Cys Thr Thr His Ser Asn		
2210	2215	2220
Thr Tyr Asp Val Asp Met Val Asp Ala Asn Leu Leu Met Glu Gly Gly		
2225	2230	2235
Val Ala Gln Thr Glu Pro Glu Ser Arg Val Pro Val Leu Asp Phe Leu		2240
2245	2250	2255
Glu Pro Met Ala Glu Glu Glu Ser Asp Leu Glu Pro Ser Ile Pro Ser		
2260	2265	2270
Glu Cys Met Leu Pro Arg Ser Gly Phe Pro Arg Ala Leu Pro Ala Trp		
2275	2280	2285
Ala Arg Pro Asp Tyr Asn Pro Pro Leu Val Glu Ser Trp Arg Arg Pro		
2290	2295	2300
Asp Tyr Gln Pro Pro Thr Val Ala Gly Cys Ala Leu Pro Pro Pro Lys		
2305	2310	2315
		2320
Lys Ala Pro Thr Pro Pro Pro Arg Arg Arg Arg Thr Val Gly Leu Ser		
2325	2330	2335
Glu Ser Thr Ile Ser Glu Ala Leu Gln Gln Leu Ala Ile Lys Thr Phe		
2340	2345	2350
Gly Gln Pro Pro Ser Ser Gly Asp Ala Gly Ser Ser Thr Gly Ala Gly		
2355	2360	2365
Ala Ala Glu Ser Gly Gly Pro Thr Ser Pro Gly Glu Pro Ala Pro Ser		
2370	2375	2380
Glu Thr Gly Ser Ala Ser Ser Met Pro Pro Leu Glu Gly Glu Pro Gly		
2385	2390	2395
Asp Pro Asp Leu Glu Ser Asp Gln Val Glu Leu Gln Pro Pro Pro Gln		2400
2405	2410	2415
Gly Gly Gly Val Ala Pro Gly Ser Gly Ser Gly Ser Trp Ser Thr Cys		
2420	2425	2430

Ser Glu Glu Asp Asp Thr Thr Val Cys Cys Ser Met Ser Tyr Ser Trp
 2435 2440 2445
 Thr Gly Ala Leu Ile Thr Pro Cys Ser Pro Glu Glu Glu Lys Leu Pro
 2450 2455 2460
 Ile Asn Pro Leu Ser Asn Ser Leu Leu Arg Tyr His Asn Lys Val Tyr
 2465 2470 2475 2480

 Cys Thr Thr Ser Lys Ser Ala Ser Gln Arg Ala Lys Lys Val Thr Phe
 2485 2490 2495
 Asp Arg Thr Gln Val Leu Asp Ala His Tyr Asp Ser Val Leu Lys Asp
 2500 2505 2510
 Ile Lys Leu Ala Ala Ser Lys Val Ser Ala Arg Leu Leu Thr Leu Glu
 2515 2520 2525
 Glu Ala Cys Gln Leu Thr Pro Pro His Ser Ala Arg Ser Lys Tyr Gly
 2530 2535 2540
 Phe Gly Ala Lys Glu Val Arg Ser Leu Ser Gly Arg Ala Val Asn His
 2545 2550 2555 2560
 Ile Lys Ser Val Trp Lys Asp Leu Leu Glu Asp Pro Gln Thr Pro Ile
 2565 2570 2575
 Pro Thr Thr Ile Met Ala Lys Asn Glu Val Phe Cys Val Asp Pro Ala
 2580 2585 2590
 Lys Gly Gly Lys Lys Pro Ala Arg Leu Ile Val Tyr Pro Asp Leu Gly
 2595 2600 2605
 Val Arg Val Cys Glu Lys Met Ala Leu Tyr Asp Ile Thr Gln Lys Leu
 2610 2615 2620
 Pro Gln Ala Val Met Gly Ala Ser Tyr Gly Phe Gln Tyr Ser Pro Ala
 2625 2630 2635 2640
 Gln Arg Val Glu Tyr Leu Leu Lys Ala Trp Ala Glu Lys Lys Asp Pro
 2645 2650 2655
 Met Gly Phe Ser Tyr Asp Thr Arg Cys Phe Asp Ser Thr Val Thr Glu
 2660 2665 2670
 Arg Asp Ile Arg Thr Glu Glu Ser Ile Tyr Gln Ala Cys Ser Leu Pro
 2675 2680 2685
 Glu Glu Ala Arg Thr Ala Ile His Ser Leu Thr Glu Arg Leu Tyr Val
 2690 2695 2700
 Gly Gly Pro Met Phe Asn Ser Lys Gly Gln Thr Cys Gly Tyr Arg Arg
 2705 2710 2715 2720
 Cys Arg Ala Ser Gly Val Leu Thr Thr Ser Met Gly Asn Thr Ile Thr
 2725 2730 2735
 Cys Tyr Val Lys Ala Leu Ala Ala Cys Lys Ala Ala Gly Ile Val Ala
 2740 2745 2750
 Pro Thr Met Leu Val Cys Gly Asp Asp Leu Val Val Ile Ser Glu Ser
 2755 2760 2765
 Gln Gly Thr Glu Glu Asp Glu Arg Asn Leu Arg Ala Phe Thr Glu Ala
 2770 2775 2780

 Met Thr Arg Tyr Ser Ala Pro Pro Gly Asp Pro Pro Arg Pro Glu Tyr
 2785 2790 2795 2800
 Asp Leu Glu Leu Ile Thr Ser Cys Ser Ser Asn Val Ser Val Ala Leu
 2805 2810 2815

Gly Pro Arg Gly Arg Arg Arg Tyr Tyr Leu Thr Arg Asp Pro Thr Thr
 2820 2825 2830
 Pro Leu Ala Arg Ala Ala Trp Glu Thr Val Arg His Ser Pro Ile Asn
 2835 2840 2845
 Ser Trp Leu Gly Asn Ile Ile Gln Tyr Ala Pro Thr Ile Trp Val Arg
 2850 2855 2860
 Met Val Leu Met Thr His Phe Phe Ser Ile Leu Met Val Gln Asp Thr
 2865 2870 2875 2880
 Leu Asp Gln Asn Leu Asn Phe Glu Met Tyr Gly Ser Val Tyr Ser Val
 2885 2890 2895
 Asn Pro Leu Asp Leu Pro Ala Ile Ile Glu Arg Leu His Gly Leu Asp
 2900 2905 2910
 Ala Phe Ser Met His Thr Tyr Ser His His Glu Leu Thr Arg Val Ala
 2915 2920 2925
 Ser Ala Leu Arg Lys Leu Gly Ala Pro Pro Leu Arg Val Trp Lys Ser
 2930 2935 2940

 Arg Ala Arg Ala Val Arg Ala Ser Leu Ile Ser Arg Gly Gly Lys Ala
 2945 2950 2955 2960
 Ala Val Cys Gly Arg Tyr Leu Phe Asn Trp Ala Val Lys Thr Lys Leu
 2965 2970 2975
 Lys Leu Thr Pro Leu Pro Glu Ala Arg Leu Leu Asp Leu Ser Ser Trp
 2980 2985 2990
 Phe Thr Val Gly Ala Gly Gly Gly Asp Ile Phe His Ser Val Ser Arg
 2995 3000 3005
 Ala Arg Pro Arg Ser Leu Leu Phe Gly Leu Leu Leu Leu Phe Val Gly
 3010 3015 3020
 Val Gly Leu Phe Leu Leu Pro Ala Arg
 3025 3030

【図面の簡単な説明】

【図 1】劇症肝炎患者の経過を示す図である。

【図 2】分子系統樹による解析の結果を示す図である。

【図 3】劇症肝炎分離株 JFH-1 と慢性肝炎 5 例から分離したウイルス株 (JCH-1 ~ 5) 及びすでに報告されている J6CF 株のコア領域のアミノ酸配列を示す図である。

【図 4】図 3 に示したアミノ酸配列を発現するウイルス遺伝子を T7 プロモーター配列とポリ A シグナル配列 (pA) の間に挿入した発現ベクターの概略図 (A)、及び該発現ベクターを鋳型としてコア蛋白質を発現させて電気泳動し、PVD F 膜に転写して抗コアモノクローナル抗体で検出した結果 (B) を示す。

【図 5】JFH-1 株と JCH-1 株を 60 番目、90 番目、160 番目のアミノ酸で入れ替えたキメラ遺伝子を T7 プロモーター配列とポリ A シグナル配列 (pA) の間に挿入した発現ベクターの概略図 (A)、及び該発現ベクターを鋳型としてコア蛋白質を発現させて電気泳動し、PVD F 膜に転写して抗コアモノクローナル抗体で検出した結果 (B) を示す。

【図 6】コア領域のみを発現する発現ベクター及び構造

遺伝子領域全体を含んだ発現ベクターの概略図 (A)、及び該発現ベクターを鋳型としてコア蛋白質を発現させて電気泳動し、PVD F 膜に転写して抗コアモノクローナル抗体で検出した結果 (B) を示す。

【図 7】実験 1 で用いた発現ベクターを細胞内に導入して細胞内で発現させて電気泳動し、PVD F 膜に転写して抗コアモノクローナル抗体で検出した結果を示す図である。

【図 8】JFH-1 株と JCH-1 株の翻訳領域全体を挿入した発現ベクターの概略図 (A)、及び該発現ベクターを細胞内に導入して細胞内で発現させて電気泳動し、PVD F 膜に転写してウエスタンブロット法で検出した結果 (B) を示す。

【図 9】NS3 から下流のウイルス遺伝子のみを挿入した発現ベクターの概略図 (A)、及び該発現ベクターを細胞内に導入して細胞内で発現させて電気泳動し、PVD F 膜に転写してウエスタンブロット法で検出した結果 (B) を示す。

【符号の説明】

ALT アラニンアミノトランスフェラーゼ

PT プロトロンビン時間

FH.ami 劇症肝炎分離株 JFH-1 のコア領域のアミノ酸配列

CH1.ami 慢性肝炎分離株 JCH-1 のコア領域のアミノ酸配列

CH2.ami 慢性肝炎分離株 JCH-2 のコア領域のアミノ酸配列

CH3.ami 慢性肝炎分離株 JCH-3 のコア領域のアミノ酸配列

CH4.ami 慢性肝炎分離株 JCH-4 のコア領域のアミノ酸配列

CH5.ami 慢性肝炎分離株 JCH-5 のコア領域のアミノ酸配列

J6CF.ami J6CF株のコア領域のアミノ酸配列

FH 劇症肝炎分離株 JFH-1

CH1-5 慢性肝炎分離株 JCH-1~5

CH1 慢性肝炎分離株 JCH-1

CH2 慢性肝炎分離株 JCH-2

CH3 慢性肝炎分離株 JCH-3

CH4 慢性肝炎分離株 JCH-4

CH5 慢性肝炎分離株 JCH-5

FH ORF 劇症肝炎分離株 JFH-1 の翻訳領域全体を挿入した発現ベクター

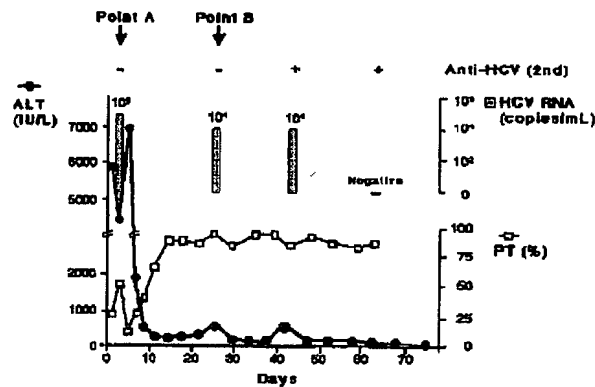
CH1 ORF 慢性肝炎分離株 JCH-1 の翻訳領域全体を挿入した発現ベクター

Cont. 陰性コントロール、HCVのcDNAを挿入していない発現ベクター

Myc human c-myc gene protein

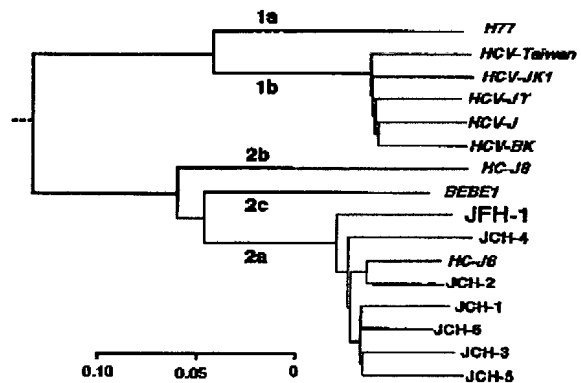
HA ヒトインフルエンザウイルスのhemagglutinin protein

【図1】



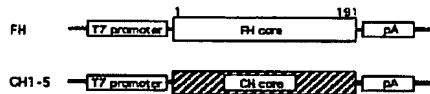
【図4】

【図2】

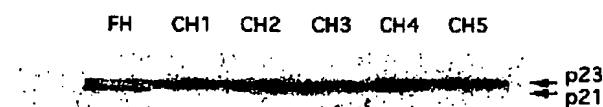


【図5】

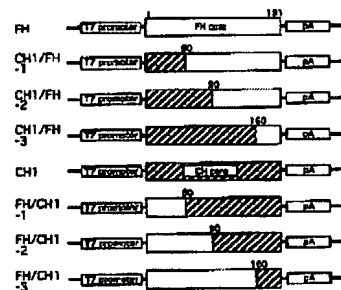
(A)



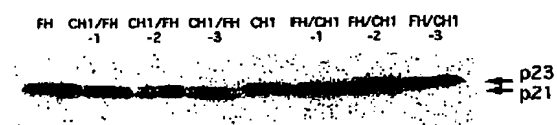
(B)



(A)



(B)

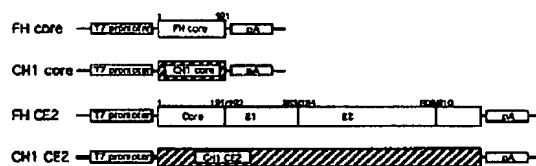


【図3】

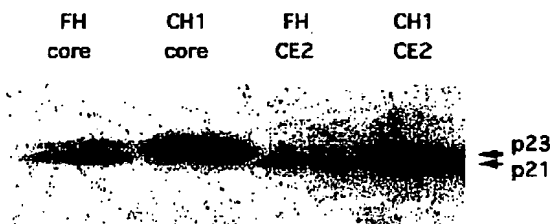
FH.am1	1	MSHNPKPQAKTKKFNRRPDDVKFPGGGQIVGGVYLDPBPGFRLGVLTTRKTSERSQPRG	50
CH1.am1	1Q.....A..A.....	50
CH2.am1	1	...T.....Q.....A.....	50
CH3.am1	1Q.....S..Q..R.....	50
CH4.am1	1Q.....A.....	50
CH5.am1	1Q.....A.....	50
J6CF.am1	1Q.....A.....	50
		,*,*****,,**,* ****,*****,,***,*****	
FH.am1	61	RRQPIPEDRRSTGRANGKFGKFWPLIGNEGLGNAGWLLSFRGSRFSNGPTDFRHSANVG	120
CH1.am1	61H.....S.....Y.....H.....	120
CH2.am1	61S.....Y.....H.....	120
CH3.am1	61S..R..Y.....H.....	120
CH4.am1	61S.....Y.....H.....	120
CH5.am1	61S.....Y.....H.....	120
J6CF.am1	61S.....Y.....H.....	120
		*****,*****,,**,* ****,*****,,***,*****	
FH.am1	121	KVIDTLTGGFADLNGYIPVVGAPLSGARAVANGVRVLEDGVNYATGNLPQFPFSIFLLA	180
CH1.am1	121L..V.....V..S..L.....F.....CS.....	180
CH2.am1	121G..V.....L.....F.....CS.....	180
CH3.am1	121G..V.....L.....CS.....	180
CH4.am1	121L.....G..V.....L.....C.....CS.....	180
CH5.am1	121I.....G..V.....L.....F.....CS.....	180
J6CF.am1	121G..V.....L.....F.....CS.....	180
		*****,*****,,**,* ****,*****,,***,*****	
FH.am1	181	LLSCITVPVBSA	191
CH1.am1	181T.....	191
CH2.am1	181I.....	191
CH3.am1	181	191
CH4.am1	181	191
CH5.am1	181I.....	191
J6CF.am1	181T.....	191
		***** ****	

【図6】

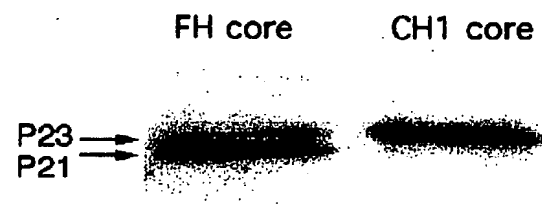
(A)



(B)

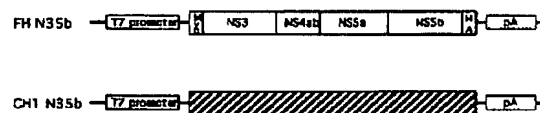


【図7】

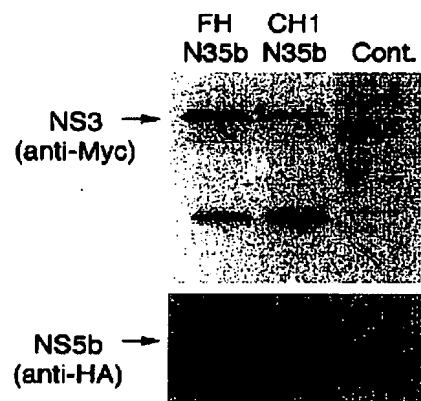


【圖 9】

(A)



(B)



(72) 発明者 森山 雅美
東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号
東レ株式会社東京事業場内
Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA32 BA80 CA04
DA03 GA11 HA11
4H045 AA10 BA10 CA02 HA07